

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE GENÓMICA Y
PROTEÓMICA AL ESTUDIO DEL SÍNDROME DE
OVARIO POLIQUÍSTICO: BÚSQUEDA DE
ALTERACIONES MOLECULARES EN EL TEJIDO
ADIPOSO OMENTAL**

TESIS DOCTORAL

MARTA CORTÓN PÉREZ

Madrid, 2006

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE GENÓMICA Y
PROTEÓMICA AL ESTUDIO DEL SÍNDROME DE OVARIO
POLIQUÍSTICO: BÚSQUEDA DE ALTERACIONES
MOLECULARES EN EL TEJIDO ADIPOSO OMENTAL

Memoria que presenta Marta Cortón Pérez,
Licenciada en Biología, para optar al título de
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora de Tesis:
Dra. Belén Peral Fuentes

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM

Belén Peral Fuentes, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid y Profesora Honoraria del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA que: **Doña Marta Cortón Pérez**, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

“Aplicación de técnicas de genómica y proteómica al estudio del Síndrome de Ovario Poliquístico: Búsqueda de alteraciones moleculares en el tejido adiposo omental”

y considera que éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firma el presente certificado en Madrid a 3 de Noviembre de 2006.

Fdo. Dra. Belén Peral Fuentes

Este trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la financiación de la Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad de Madrid (proyectos 08.6/0024/2000.1 y 08.6/0021/2003) y del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (proyecto PI02/0578 y RCMN C03/08).

A Marisé, mi madre

Na boa poesía, como na boa ciencia, cada palabra é una chave, mais tamén una pechadura. Descóbrenos un segredo mais tamén suxire outros, e o que nos prende é esa mestura de claridade e misterio, o espacio neboento onde se debuxa e desdebuxa o ser humano.

Eduardo Pondal

Resumen/ Summary

El Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS) es la endocrinopatía más común en mujeres en edad fértil. Se caracteriza principalmente por hiperandrogenismo y oligovulación crónica, y suele asociarse a otras patologías como insulinoresistencia, diabetes tipo 2 y obesidad. El PCOS es una enfermedad poligénica, resultado de la interacción de múltiples genes de susceptibilidad con factores ambientales, pero las distintas aproximaciones genéticas aplicadas en la búsqueda de dichos genes han sido infructuosas. Estudios previos han puesto de manifiesto que existen alteraciones en la acción de la insulina, la lipólisis y la producción de citoquinas en el tejido adiposo en pacientes con PCOS. Estas evidencias indican que dicho tejido, principalmente con localización abdominal, podría desempeñar un papel aún no definido en el desarrollo de las anomalías endocrinas y metabólicas del PCOS. Por tanto, con el fin de estudiar la implicación de dicho tejido en la fisiopatología del PCOS, se han buscado genes, proteínas y procesos biológicos desregulados en el tejido adiposo omental de pacientes con PCOS con respecto a mujeres no hiperandrogénicas mediante estudios de genómica y proteómica comparativa, utilizando *microarrays* de ADN y electroforesis bidimensional de proteínas, respectivamente. Tras este estudio podemos concluir que las alteraciones encontradas afectan, no sólo a la acción de la insulina, sino también a procesos de estrés oxidativo e inflamación, a la ruta de señalización de Wnt y a la función inmune, entre otros.

The polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy in women of reproductive age, and is characterized by hyperandrogenism and chronic anovulation. PCOS is frequently associated with obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. Familial aggregation provides evidence supporting a genetic basis for PCOS, but the precise genetic mechanisms remain unknown despite significant efforts. PCOS appears to be a complex disorder in terms of inheritance, in which protective and predisposing genomic variants interfere with a very important environmental influence. Given the central role of visceral adipose tissue in the development of PCOS in overweight and obese women, we have considered of interest the study of genes and protein expression profiles of omental fat biopsies obtained from morbidly obese women with or without PCOS, by using genomics and proteomics strategies. These methods have revealed abnormal expression of genes, proteins and biological pathways, related to insulin- and Wnt-signaling, to oxidative stress, inflammation, immune function and lipid metabolism, among others. These findings suggest that the involvement of abdominal obesity in the pathogenesis of PCOS is more ample than previously thought, and not restricted to the induction of insulin resistance.

ÍNDICE

Índice General

<i>Resumen/ Summary</i>	- 7 -
<i>Índice</i>	- 8 -
<i>Abreviaturas</i>	- 13 -
1. Introducción	- 16 -
1.1. Definición y diagnóstico del PCOS.....	- 17 -
1.2. Fisiopatología del PCOS.....	- 19 -
1.2.1. Anomalías neuroendocrinas en el PCOS.....	- 21 -
1.2.2. Anomalías esteroideogénicas en el PCOS.....	- 22 -
1.3. Resistencia insulínica y anomalías metabólicas en el PCOS.....	- 25 -
1.3.1. Rutas de señalización de la insulina y resistencia a insulina.....	- 26 -
1.3.2. Mecanismos moleculares de resistencia a insulina en el PCOS.....	- 27 -
1.3.3. Asociación entre resistencia a insulina e hiperandrogenemia.....	- 30 -
1.4. Estudios genéticos en el PCOS.....	- 30 -
1.5. Estudios genómicos en el PCOS.....	- 34 -
2. Objetivos	- 37 -
3. Materiales y métodos	- 38 -
3.1. Sujetos y materiales de estudio.....	- 39 -
3.2. Estudios caso-control.....	- 40 -
3.3. Estudio de expresión génica diferencial.....	- 42 -
3.3.1. Extracción de ARN.....	- 42 -
3.3.2. Síntesis y marcaje del ARNc.....	- 43 -
3.3.3. Hibridación en los <i>microarrays</i>	- 43 -
3.3.4. Análisis de la imagen y normalización.....	- 44 -
3.3.5. Análisis estadístico de los datos de <i>microarrays</i>	- 45 -
3.4. Validación de los estudios de expresión génica por RT- <i>qPCR</i>	- 47 -
3.5. Estudios de expresión proteica.....	- 48 -
3.5.1. Estudio proteómico de la expresión diferencial en el tejido adiposo.....	- 48 -
3.5.2. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	- 52 -
3.5.3. <i>Western blot</i>	- 53 -

3.6. Direcciones web utilizadas durante este trabajo.....	55 -
3.6.1. Bases de datos.....	55 -
3.6.2. Programas bioinformáticos.....	55 -
4. Resultados y discusión	- 57 -
4.1. Asociación del PCOS con variantes alélicas implicadas con Síndrome Metabólico.	-58 -
4.2. Estudio de la expresión génica diferencial en PCOS mediante <i>microarrays</i> de ADN.	-62 -
4.2.1. Descripción de sujetos de estudio.....	63 -
4.2.2. Control de calidad de los <i>microarrays</i>	65 -
4.2.3. Análisis de la expresión génica diferencial.....	67 -
4.2.4. Validación de los niveles de expresión por RT- <i>q</i> PCR.....	72 -
4.3. Búsqueda de rutas metabólicas o procesos biológicos desregulados en el PCOS....	- 74 -
4.3.1. Análisis de ontologías.....	75 -
4.3.2. Asociaciones de coexpresión y coregulación entre los genes desregulados....	- 77-
4.3.3. Análisis <i>a priori</i> de <i>microarrays</i>	80 -
4.4. Análisis de la expresión proteica en el tejido adiposo de pacientes con PCOS.....	- 85 -
4.4.1. Optimización de protocolos de 2DE en tejido adiposo.....	85 -
4.4.2. Estudio de la expresión diferencial de proteínas en PCOS.....	92 -
4.4.3. Validación de las diferencias de expresión por <i>Western blot</i>	99 -
4.5. Evaluación de procesos biológicos alterados en el PCOS.....	- 101 -
4.5.1. Evidencias de alteraciones en la señalización de insulina.....	102 -
4.5.2. Evidencias de alteraciones en procesos de estrés oxidativo.....	106 -
4.5.3. Evidencias de alteraciones en el metabolismo lipídico.....	109 -
4.5.4. Evidencias de alteraciones en la ruta de señalización de Wnt.....	111 -
4.5.5. Evidencias de alteraciones en genes implicados en Síndrome Metabólico....	- 113 -
4.5.6. Evidencias de alteraciones en la esteroidogénesis.....	114 -
4.5.7. Evidencias de alteraciones en funciones inmunológicas.....	115 -
5. Conclusiones	- 117 -
<i>Bibliografía</i>	- 120 -
<i>Publicaciones</i>	- 137 -

Índice de Figuras

1.1. Evolución temporal de las morbilidades en el PCOS.	17 -
1.2. El eje hipotalámico-hipofisario-ovárico en el PCOS.....	20 -
1.3. Esquema general de la ruta de biosíntesis de hormonas esteroideas.....	23 -
1.4. Rutas de señalización y acción de la insulina.....	28 -
4.1. Visualización de la distribución de los datos normalizados de <i>microarrays</i> ..	67 -
4.2. Agrupamiento jerárquico de los genes desregulados en el tejido adiposo omental.....	78 -
4.3. Esquema del método FatiScan.	81 -
4.4. Términos de GO con mayor o menor representación.....	82 -
4.5. Niveles de expresión de la familia génica GSTM en el tejido adiposo omental.....	83 -
4.6. Mejora de la resolución de las proteínas con el empleo de DTT.....	87 -
4.7. Perfil proteico del tejido adiposo omental en geles 6-11..	87 -
4.8. Perfil proteico del tejido adiposo omental en geles 3-10.	88 -
4.9. Proteoma del tejido adiposo omental.....	90 -
4.10. Diseño experimental del análisis de la expresión diferencial de proteínas en el tejido adiposo omental de PCOS y controles.	92 -
4.11. Diseño experimental utilizando la técnica 2DE-DIGE.....	94 -
4.12. Perfil proteómico del tejido adiposo omental	96 -
4.13. Representación de la expresión proteica en 3D.	96 -
4.14. Análisis por espectrometría de masas de la proteína GSTM3.	98 -
4.15. <i>Western Blot</i> de la proteína GSTM3..	100 -
4.16. Expresión proteica de NQO1, HSD11B1 y NPR3.....	101 -
4.17. Alteraciones en la señalización de insulina en el tejido adiposo en el PCOS.....	103 -

Índice de Tablas

2.1. Marcadores polimórficos estudiados en genes candidatos para PCOS.....	40 -
2.2. Condiciones de la PCR utilizados en el estudio de asociación.....	41 -
2.3. Programa básico de isoelectroenfoque.....	50 -
2.4. Programa de isoelectroenfoque utilizado para DIGE.....	51 -
2.5. Anticuerpos y condiciones utilizados en los <i>Western blot</i>	54 -
4.1. Características clínicas de los individuos utilizados en el estudio de asociación.....	59 -
4.2. Frecuencias genotípicas de las variantes alélicas estudiadas.....	60 -
4.3. Características clínicas y bioquímicas de los individuos del estudio con <i>microarrays</i>	64 -
4.4. Calidad de la hibridación en los <i>microarrays</i>	66 -
4.5. Sondas con expresión disminuida en el PCOS.....	70 -
4.6. Sondas con expresión aumentada en el PCOS.....	71 -
4.7. Validación por RT- <i>q</i> PCR de genes con expresión disminuida.....	72 -
4.8. Validación por RT- <i>q</i> PCR de genes con expresión aumentada.....	73 -
4.9. Términos de GO con representación diferencial en el PCOS.....	76 -
4.10. Proteínas del tejido adiposo omental identificadas mediante MALDI-TOF.....	91 -
4.11. Proteínas diferencialmente expresadas en el PCOS.....	97 -

Abreviaturas

11β-HSD	Enzima 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa
17β-HSD	Enzima 17 β -hidroxisteroide deshidrogenasa
17-OHP	17-Hidroxiprogesterona
17OHP5	17 α -hidroxipregnenolona
2DE	Electroforesis bidimensional (<i>2-Dimensional Electrophoresis</i>)
3β-HSD	Enzima 3 β -hidroxisteroide-deshidrogenasa
A	Sondas denominadas “Ausentes”
ACTH	Corticotropina
AKR	Enzimas aldo-keto reductasas
ALDH	Enzima aldehído deshidrogenasa
AMH	Hormona antimulleriana
ANP	Péptido natriurético de tipo A
ApoA1	Apolipoproteína A1
AR	Receptor de andrógenos
ARTS1	<i>Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator</i>
BMPs	Proteínas morfogenéticas de hueso
CAPN	Calpaína
CHAPS	Sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propano
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CV	Coefficiente de variación
CYP11	Gen de la enzima P450 _{scc}
CYP17	Gen de la enzima P450 _{c17}
DHEAS	Sulfato de deshidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DIGE	<i>Differential In Gel Electrophoresis</i> .
DKK1	<i>Dickkopf homolog 1</i>
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> de tipo 2
DTT	1,4-ditiotreitol
EBF	<i>Early B-cell factor</i>
ENPP1	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FOX	Factores de transcripción de la familia <i>Fork head</i>
FSH	Hormona foliculoestimulante
GAPDH	Enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GLUT4	Receptor de glucosa insulín dependiente
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas (<i>Gonadotrophins Releasing Hormone</i>)
GSH	Glutation en estado reducido
GSTM	Enzimas glutatión S-reductasas
GO	Consortio de <i>Gene Ontology</i>
GUSB	Glucuronidasa β
HDL	Lipoproteína de alta densidad (<i>High-density lipoprotein</i>)
HDL-c	Colesterol asociado a partículas HDL
HED	Disulfuro de hidroxietilo
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HNF	Factor nuclear hepático
HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSL	Lípasa hormonosensitiva
IEF	Isoelectroenfoque
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGFBP1	<i>IGF-binding protein 1</i>
IMC	Índice de Masa Corporal
IPG	Gradientes de pH inmovilizados (<i>Immobilized pH Gradient</i>)
IQR	Rango Intercuartil

IR/ INSR	Receptor de insulina
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>Low-density lipoprotein</i>)
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LH	Hormona luteinizante
LO	Enzima lipoxigenasa
MALDI	Ionización/desorpción por láser asistida por matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MAS5.0	<i>Microarray Suite 5.0</i>
MHC	Molécula de histocompatibilidad
MM	Sonda desemparejada (<i>Mismatch Probe</i>)
MS	Espectrometría de Masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, Estados Unidos
NIH	Instituto Nacional de la Salud, Estados Unidos
NP-40	Nonidet P-40
NPR	Receptor de péptidos natriuréticos
NQO1	Enzima NADH-ubiquinona oxidoreductasa
P	Sondas denominadas “Presentes”
P450c17	Enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa
P450scc	<i>Cholesterol side-chain cleavage</i>
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PC-1	<i>Plasma cell differentiation factor-1</i>
PCOS	Síndrome de Ovario Poliquístico
PCYOX	Enzima prenilcisteína oxidasa
PDE3B	Enzima fosfodiesterasa 3B
pI	Punto isoelectrico
PI3K	Enzima fosfatidil-inositol 3-quinasa
PIK3R1	Subunidad reguladora p85 de la enzima PI3K
PKN2	Proteína quinasa C-like 2
PM	Sondas con emparejamiento perfecto (<i>Perfect Matches probes</i>)
PON1	Paroxonasa 1
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PPIA	Ciclofilina A (<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>)
PSMF	<i>Phenylmethyl-sulfonylfluoride</i>
PTPs	Proteínas tirosín-fosfatasas (<i>Phosphatases Tyrosin Proteins</i>)
PVDF	Difloruro de polivinilideno
RETN	Resistina
RFLP	Polimorfismos de los fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RHOQ	Gen de la familia Rho que codifica la proteína TC10
RMA	<i>Robust Multichip Average</i>
ROS	Especie reactiva de oxígeno
SAM	<i>Significance Analysis of Microarray</i>
SCD	Enzima estearoil-CoA desaturasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SF	Factor de escalado (<i>Scaling Factor</i>)
SHBG	Globulina de unión a hormonas sexuales (<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis (<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>)
TCEP-HCl	<i>Tris(2-Carboxyethyl) Phosphine Hydrochloride</i>
TFBSs	Sitios de unión para factores de transcripción (<i>Transcription Factor Binding Sites</i>)
TGF	Factor de crecimiento transformante (<i>Transforming Growth Factor</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time Of Flight</i>)
V	Voltios
V:h	Voltios:hora
VNTR	Repeticiones en tandem de número variable (<i>Variable Number Tandem Repeats</i>)
Wnt	<i>Wingless-related MMTV integration site 4</i>
WT	Alelo silvestre (<i>Wild type</i>)

1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS) es la endocrinopatía más frecuente en mujeres premenopáusicas, afectando al 6.5% de la población española (Asunción *et al.*, 2000). El PCOS se caracteriza principalmente por hiperandrogenemia y oligovulación crónica, y se asocia con frecuencia a distintas manifestaciones clínicas del denominado síndrome metabólico (Apridonidze *et al.*, 2005), entre las cuales, la resistencia insulínica, la hiperinsulinemia y la obesidad parecen estar directamente implicadas en su etiología (Sam & Dunaif, 2003). El PCOS representa un factor de riesgo para el desarrollo de otras patologías, como diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), aterosclerosis, enfermedades coronarias y cáncer endometrial (Legro, 2003). Por todo ello, se ha postulado que el PCOS puede ser una manifestación del síndrome metabólico en edades tempranas, en donde la combinación de hiperandrogenemia, resistencia a insulina en tejidos periféricos y su hiperinsulinemia compensatoria predisponga a la aparición de dislipidemia y enfermedades coronarias a medio o largo plazo (Figura 1.1) (Reaven, 2005).

Hasta el momento no se han descrito ni factores etiológicos ni defectos genéticos que expliquen completamente el conjunto de alteraciones endocrinas y metabólicas del PCOS (Ehrmann, 2005). En términos genéticos, el PCOS presenta una herencia compleja como resultado de la interacción de distintos genes de susceptibilidad con factores ambientales (Crosignani & Nicolosi, 2001). A pesar de todos los esfuerzos realizados en la búsqueda de posibles genes candidatos para el PCOS, hasta el momento no se han identificado genes de susceptibilidad que hayan sido confirmados en trabajos independientes debido, en gran parte, a la dificultad para obtener poblaciones de estudio homogéneas dada la variabilidad en las manifestaciones clínicas del PCOS (Roldan *et al.*, 2004).

El desarrollo de técnicas de alto rendimiento que permiten el análisis en paralelo de la expresión de miles de genes o proteínas ha supuesto un cambio en la manera de abordar el estudio de las enfermedades complejas. Así, pensamos que la aplicación de técnicas de genómica y proteómica al estudio del PCOS podría ser decisiva en la identificación de alteraciones, bien en redes genéticas reguladoras o bien en cascadas de transducción de señal, que pudieran estar contribuyendo en su patogénesis, y asimismo, en la caracterización de genes potencialmente candidatos para el PCOS.

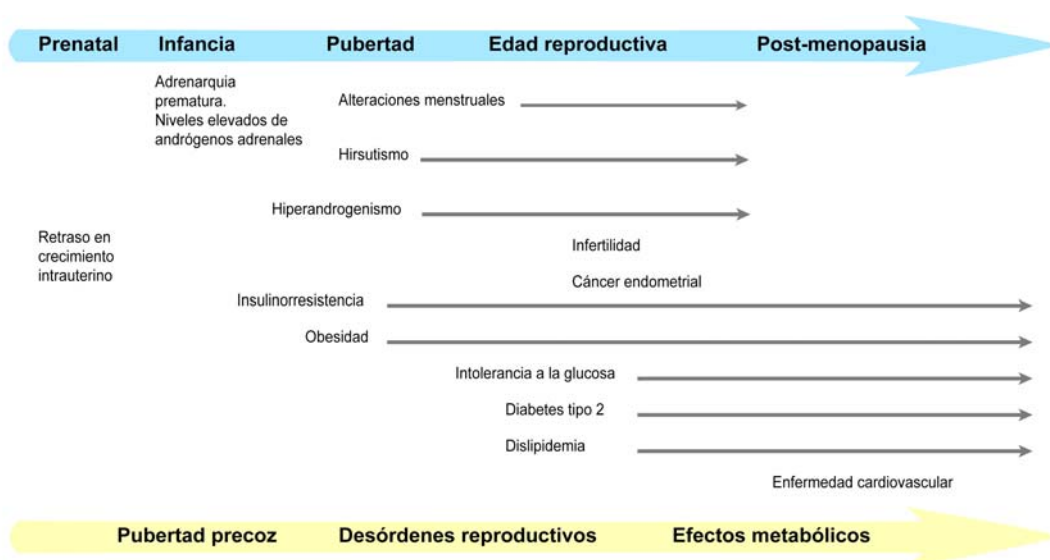


Figura 1.1. Evolución temporal de las morbilidades del PCOS en las mujeres afectadas. Niñas con adrenarquia prematura y resistencia a insulina presentan riesgo elevado a sufrir PCOS. En adolescentes, las principales manifestaciones clínicas del PCOS son las irregularidades menstruales y el hirsutismo. Durante la edad reproductiva, la infertilidad y el cáncer de endometrio son otras de las complicaciones a nivel reproductivo del PCOS. Las mujeres premenopáusicas con PCOS presentan riesgo elevado de sufrir diabetes de tipo 2, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares (adaptado de Sam & Dunaif, 2003)

1.1. DEFINICIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL PCOS.

Aunque fue descrito por primera vez en 1935 por Stein & Leventhal, en la actualidad se sigue describiendo al PCOS como un síndrome, y no como enfermedad (Franks, 1995). La complejidad en las manifestaciones clínicas y su variación a lo largo de la vida de las mujeres afectadas (Figura 1.1) han dificultado la obtención de una definición consensuada y de un criterio universalmente aceptado para el diagnóstico del PCOS.

La mayoría de los clínicos de Estados Unidos y del sur de Europa utilizan la definición de PCOS derivada de la conferencia de expertos organizada en 1990 por el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos, que incluye la presencia de: i) hiperandrogenismo clínico (hirsutismo, acné, alopecia androgénica) o bioquímico (niveles plasmáticos elevados de testosterona total y libre, androstenediona o DHEAS), ii) disfunción menstrual (oligomenorrea o amenorrea), junto con la exclusión de otras condiciones médicas que causen ciclos menstruales irregulares y exceso androgénico, como hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congénita, tumores secretores de andrógenos o síndrome de Cushing (Zawadzki, 1992).

En el 65-87% de las mujeres con oligomenorrea y en el 60-92% de las mujeres con hirsutismo se observan ovarios poliquísticos por ultrasonidos (Abdel Gadir *et al.*, 1992;

Adams *et al.*, 1986), sin embargo esta característica aparece asimismo en el 17-40% de la población normal (Borgfeldt & Andolf, 1999; Clayton *et al.*, 1992; Michelmore *et al.*, 1999), en el 50% de las pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa (Azziz & Owerbach, 1995), y en pacientes con hiperprolactinemia o síndrome de Cushing (Dewailly, 1997). Por ello, en el criterio del NIH no se considera necesaria la poliquistosis ovárica como requisito obligado en el diagnóstico del PCOS. Por el contrario, la observación de ovarios poliquísticos de forma asociada a hiperandrogenismo sí es un requisito obligatorio para el diagnóstico del PCOS realizado por los clínicos del resto de países europeos, Asia y Oceanía, sin que se requiera como necesaria la presencia de disfunciones menstruales (Homburg, 2002). Por esta razón, otro grupo internacional de expertos reunidos en 2003 en Rotterdam (Holanda) propuso la revisión de los criterios diagnósticos del PCOS, recomendando que el PCOS sea definido por la presencia de dos de las tres características siguientes: i) oligovulación o anovulación, ii) niveles elevados de andrógenos circulantes o manifestaciones clínicas de exceso androgénico e, iii) ovarios poliquísticos, tras la exclusión previa de otras etiologías que produzcan exceso androgénico (Rotterdam Sponsored PCOS Consensus Workshop, 2004).

Existen otras características que se presentan asociadas al PCOS en un número significativo de las pacientes, pero que han sido excluidas de las recientes definiciones del PCOS. Así, la infertilidad, con una prevalencia del 35-94% en las mujeres con PCOS, sí estaba incluida en la descripción original por Stein & Leventhal (Franks, 1995). De igual forma, las mujeres con PCOS suelen presentar alteraciones en la secreción de gonadotropinas, reflejadas en un aumento de los niveles de LH y en el ratio LH/FSH, con una prevalencia que varía entre el 30 y el 90% en función de la especificidad del tipo de ensayo utilizado para medir el nivel de gonadotropinas (Conway *et al.*, 1989; Franks, 1989). Tampoco se valoran las alteraciones metabólicas asociadas al PCOS en el diagnóstico a pesar de que el 50-70% de las mujeres con PCOS muestran evidencias de resistencia a insulina (Dunaif, 1997; Legro *et al.*, 1998b) y que el 30-88% de las pacientes presentan sobrepeso u obesidad (Barber *et al.*, 2006). La obesidad se asocia con una mayor severidad en las manifestaciones del hiperandrogenismo, irregularidades menstruales e infertilidad (Ehrmann, 2005; Gambineri *et al.*, 2002). En relación con esta observación, las mujeres con PCOS, con independencia del peso, presentan mayor adiposidad en región abdominal, reflejada por el índice cintura-cadera, que mujeres controles (Strowitzki *et al.*, 2002). El PCOS aumenta el riesgo a desarrollar intolerancia a la glucosa y DMT2 en el 30-40% y el 10% de las pacientes con PCOS, respectivamente (Ehrmann *et al.*, 1999), y aún más en

presencia de obesidad; así entre el 30 y el 50% de las pacientes obesas con PCOS terminan desarrollando estas patologías antes de los 30 años (Legro *et al.*, 1998b; Norman *et al.*, 2001a). La dislipidemia, definida como el aumento de triglicéridos y la disminución de HDL-colesterol, también está presente en el 70% de las mujeres con PCOS (Legro *et al.*, 2001).

La gran variabilidad de las manifestaciones clínicas del PCOS puede indicar la existencia de múltiples fenotipos asociados al síndrome. En esta dirección, se ha descrito que las pacientes con PCOS se pueden clasificar en distintos subgrupos clínicos en función del grado de sus alteraciones endocrinas y metabólicas. Así, el grado de manifestación del síndrome varía entre formas completas con oligomenorrea, hiperandrogenismo e hirsutismo, frecuentemente asociadas a estados más severos de resistencia insulínica y obesidad, y formas más leves, en las que sólo se manifiestan algunos de los síntomas, como hirsutismo e hiperandrogenismo, normalmente con afecciones metabólicas y reproductivas más leves (Carmina *et al.*, 2005a; Chang *et al.*, 2005).

1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL PCOS.

El estudio de los posibles factores etiológicos del PCOS se ve dificultado por la heterogeneidad en las manifestaciones clínicas, la falta de consistencia en los criterios de diagnóstico y las diferencias étnicas en las poblaciones empleadas. Por todo ello, hasta el momento no se ha podido establecer el mecanismo primario que desencadena el PCOS. Sigue sin esclarecerse si el PCOS representa una única patología endocrino-metabólica que presenta múltiples fenotipos debidos a la interacción de varios mecanismos fisiopatológicos, o por el contrario engloba varias patologías con una presentación clínica similar (Chang *et al.*, 2005). Tradicionalmente, se ha considerado que el PCOS es una patología compleja, resultado de la asociación de alteraciones en la función ovárica con disfunciones sistémicas en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal o en los mecanismos de secreción y acción de la insulina. Todas estas alteraciones endocrinas se retroalimentan unas de otras en forma de círculo vicioso que puede ser iniciado en cualquiera de los distintos puntos de entrada para conducir al mismo resultado: el exceso androgénico (Figura 1.2).

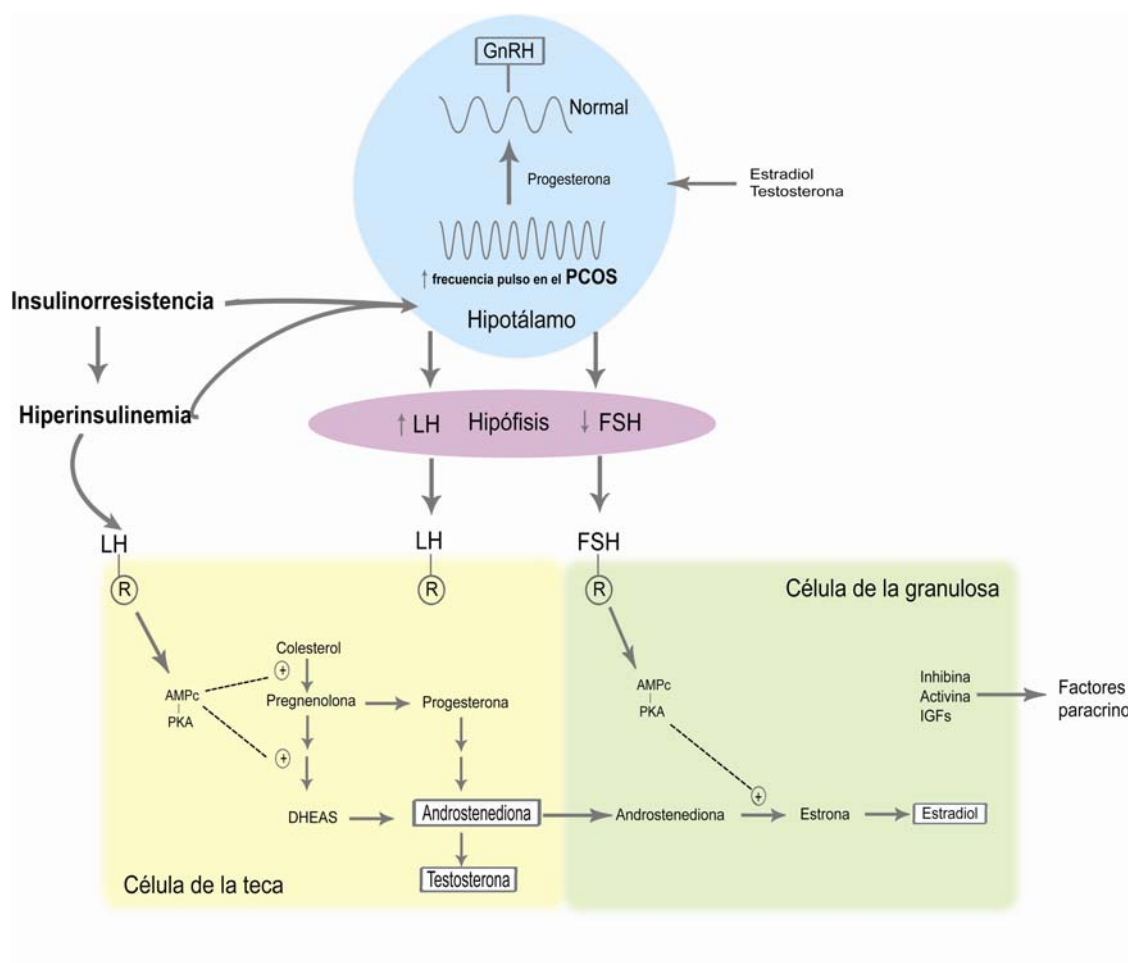


Figura 1.2. El eje hipotalámico-hipofisario-ovárico en el PCOS. La frecuencia de los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se encuentra aumentada en el PCOS, favoreciéndose la secreción de hormona luteínica (LH) sobre la liberación de hormona estimuladora de folículos (FSH). En las células tecales se produce un aumento en la actividad de varias enzimas esteroidogénicas, tanto a nivel basal como en respuesta a la LH, conduciendo al incremento en la síntesis de andrógenos. Al mismo tiempo, la menor liberación de FSH conduce a una menor aromatización de andrógenos a estradiol. La insulina estimula de forma directa la esteroidogénesis en las células de la teca ovárica en sinergia con la LH. Otros factores autocrinos, paracrinos y endocrinos modulan los efectos de la insulina y la LH sobre la producción de andrógenos.

Con objeto de explicar la patogénesis del PCOS se han postulado distintas hipótesis, todas ellas basadas en la posible existencia de alteraciones primarias de orígenes diferentes: i) una hipótesis central, donde defectos neuroendocrinos primarios conducirían al aumento en la secreción de la hormona luteínica (LH); ii) una hipótesis periférica, con defectos en la producción ovárica o adrenal de andrógenos; iii) la hipótesis insulínica, donde defectos primarios en la acción de la insulina conducirían a insulinoresistencia e hiperinsulinemia (Salehi *et al.*, 2004; Tsilchorozidou *et al.*, 2004).

1.2.1. Anomalías neuroendocrinas en el PCOS.

El principal componente neuroendocrino en el PCOS implica alteraciones en el patrón de secreción de gonadotropinas, con un incremento en la concentración de LH y niveles de FSH de bajos a normales. Los niveles elevados de LH en el PCOS se deben en parte al aumento en la sensibilidad hipofisaria a la estimulación por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), pero asimismo, se ha descrito que las mujeres con PCOS presentan mayores frecuencias en los pulsos de GnRH (Waldstreicher *et al.*, 1988). En consecuencia, se favorece la síntesis de LH sobre la producción de FSH, lo que determina el aumento del ratio LH/FSH.

Los mecanismos responsables de las alteraciones en el eje hipotalámico-hipofisario en el PCOS no han sido totalmente definidos dado que ninguna de las hipótesis propuestas pueden explicar completamente todos los defectos neuroendocrinos subyacentes. Aunque no se descarta la existencia de defectos primarios aún no identificados (Doi *et al.*, 2005), numerosas evidencias indican que la hipersecreción de LH en el PCOS se produce de forma secundaria a otros factores mediante mecanismos de retroalimentación negativa (Barontini *et al.*, 2001) (Figura 1.2). Así, durante la adrenarquia o la pubertad, la insulina, factores paracrinós u hormonas sexuales pueden alterar los pulsos de GnRH en adolescentes con PCOS (Apter *et al.*, 1995). En las mujeres adultas con PCOS, la elevación crónica de los niveles de estrona, estrógeno derivado de la aromatización de la androstenediona, aumenta la sensibilidad hipofisaria a GnRH (Barontini *et al.*, 2001). Además, los bajos niveles de progesterona presentes en estas mujeres, resultado de los continuos eventos anovulatorios, aumentan la frecuencia de los pulsos de GnRH (Eagleson *et al.*, 2000; Ehrmann, 2005). Asimismo, se ha postulado el posible rol en la fisiopatología del PCOS de neurotransmisores hipotalámicos, como la dopamina y algunos opiáceos (Barnes & Lobo, 1985).

A pesar de los claroscuros en el origen de la hipersecreción de LH en el PCOS, sus consecuencias son bien conocidas: estimulación de la esteroidogénesis ovárica y anovulación. Los niveles elevados de LH aumentan la producción de andrógenos en células de la teca, los cuáles son parcialmente aromatizados a estrógenos por las células de la granulosa (Figura 1.2). Tanto andrógenos como estrógenos retroalimentan la producción de LH, cerrándose así el ciclo vicioso del PCOS (Barontini *et al.*, 2001; Sam & Dunaif, 2003). Por otro lado, los niveles elevados de LH/FSH contribuyen a la anovulación a través del bloqueo del desarrollo folicular.

1.2.2. Anomalías esteroidogénicas en el PCOS.

En el modelo periférico se postula la existencia de defectos primarios en la esteroidogénesis ovárica o adrenal, los cuales serían responsables del exceso androgénico y, con ello del desarrollo del PCOS mediante mecanismos de retroalimentación positiva a nivel central.

1.2.2.1. Secreción de andrógenos.

Las rutas esteroidogénicas median la conversión del colesterol en las diferentes hormonas sexuales esteroideas, incluyendo progesterona, andrógenos y estrógenos. Los andrógenos son secretados principalmente por los ovarios y las glándulas adrenales en respuesta a sus respectivas hormonas tróficas, LH y ACTH, respectivamente. Los pasos iniciales y limitantes de las rutas de síntesis de todas las hormonas esteroideas conducen a la conversión de colesterol a pregnenolona (Figura 1.3). La proteína StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) promueve la translocación de colesterol desde la membrana mitocondrial exterior a la interior, donde es seguidamente convertido a pregnenolona por la enzima P450_{scc} (Miller, 2002). Otra enzima clave y limitante en la síntesis de andrógenos es la P450_{c17}, con actividad 17 α -hidroxilasa y actividad 17,20-liasa. Cataliza la hidroxilación de pregnenolona a 17 α -hidroxipregnenolona (17OHP5) y su posterior conversión a dehidroepiandrosterona (DHEA). Mediante la acción consecutiva de las enzimas 3 β -hidroxisteroide-deshidrogenasa de tipo II (3 β -HSDII) y 17 β -hidroxisteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD), se obtiene testosterona a partir de DHEA. La enzima 3 β -HSDII cataliza la síntesis de androstenediona, aunque asimismo interviene en la síntesis de progesterona, mientras que la 17 β -HSD es esencial en la formación de testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (Miller, 2002) (Figura 1.3).

Debido a la especificidad celular y tisular de la expresión de las enzimas esteroidogénicas, la producción de estradiol en el ovario depende de la acción conjunta de los dos tipos de células que forman el folículo ovárico, las células de la granulosa y las células de la teca interna (Magoffin, 2005). Además, la función esteroidogénica del ovario está influida por la acción de la LH sobre las células de la teca y de la FSH sobre las células de la granulosa. Así, en respuesta a la LH, las células de la teca producen andrógenos, gracias a que expresan el gen CYP17, que codifica para la enzima P450_{c17}; tras su difusión a las células de la granulosa, los andrógenos tecales son convertidos a estrógenos mediante la actividad de la aromatasa P450 y bajo la influencia de la FSH (Voutilainen *et al.*, 1986).

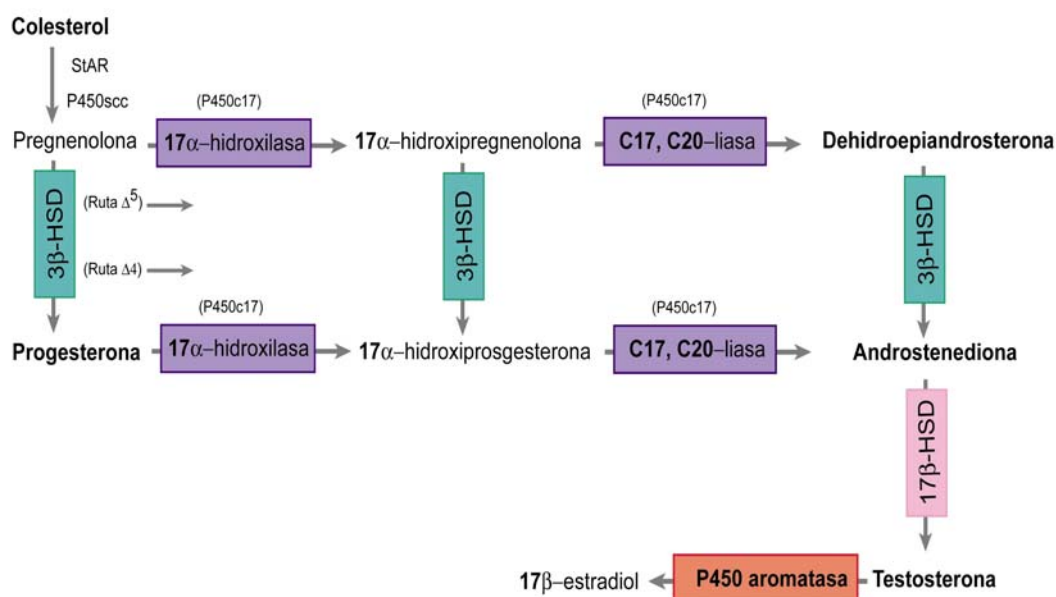


Figura 1.3. Esquema general de la ruta de biosíntesis de hormonas esteroideas.

1.2.2.2. Alteraciones en la esteroidogénesis ovárica en el PCOS

Los ovarios de las mujeres con PCOS se caracterizan por hipertrofia tecal y sobreproducción de andrógenos (Rosenfield, 1999). El exceso de andrógenos interfiere en la selección del folículo dominante durante el proceso de maduración de los folículos ováricos, conduciéndolos a un estado de atresia y, con ello, promoviendo el desarrollo de poliquistosis ovárica (Hillier & Tetsuka, 1997).

El aumento en la expresión o en la actividad de diversas enzimas esteroidogénicas en las células de la teca de pacientes con PCOS, como P450scc, P450c17 y 3β-HSD, conducen al incremento en la producción de andrógenos, tanto de forma basal como en respuesta a LH (Daneshmand *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 1999; Wickenheisser *et al.*, 2000). Este fenotipo esteroidogénico es estable y persiste a lo largo tiempo en cultivos de células tecales, lo que sugiere que la producción elevada de andrógenos puede ser un rasgo determinado de forma genética (Nelson *et al.*, 2001).

Dada la importancia del papel de la enzima P450c17 en la secreción de andrógenos ováricos, se ha postulado que posibles defectos primarios a este nivel serían los responsables de la hiperandrogenemia en el PCOS (Ehrmann *et al.*, 1995). Apoyando esta teoría, se ha visto que la actividad del promotor del gen CYP17 está aumentada en las células tecales procedentes de pacientes con PCOS en comparación con controles (Wickenheisser *et al.*,

2000). Sin embargo, estos estudios se han realizado en células mantenidas en cultivo, por lo que no se puede descartar que las diferencias observadas se deban a diferencias en el ambiente hormonal *in vivo* a las que han estado sometidas las células de forma previa al cultivo *in vitro*, mas que a defectos intrínsecos del gen asociados al PCOS. Por otro lado, se ha descrito que en el PCOS se produce el aumento en la inducción de la actividad 17, 20-liasa de la enzima P450c17 por fosforilación en residuos específicos de serina, defecto que parece ser característico de la patología y que conduce a la sobreproducción androgénica (Zhang *et al.*, 1995).

Existen evidencias que indican que el exceso androgénico no tiene origen en la disregulación de una única actividad enzimática sino en la acción coordinada de varias enzimas esteroidogénicas, junto con la implicación de distintos mecanismos de regulación. Los genes esteroidogénicos se inducen en respuesta a gonadotrofinas con la mediación del AMPc como segundo mensajero (Voutilainen *et al.*, 1986), pero la ruta exacta de señalización no ha sido completamente establecida, y existen evidencias para la implicación de vías alternativas de transducción a través de receptores acoplados a proteínas G y de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Conti, 2002; Richards, 2001). Otros factores endocrinos que también regulan la expresión de los genes esteroidogénicos en el ovario influyen asimismo en el desarrollo del PCOS. La insulina, actuando sola o en sinergia con LH, induce la expresión de los genes esteroidogénicos StAR, CYP17 y CYP11A y, con ello, la producción ovárica de andrógenos (Kiriakidou *et al.*, 1996; McGee *et al.*, 1996). Algunos factores de crecimiento ováricos, como inhibinas, activinas, BMPs (proteínas morfogénicas de hueso) y la hormona antimulleriana (AMH), regulan la secreción de gonadotropinas en la hipófisis y, de forma paracrina, la esteroidogénesis ovárica (Bedecarrats *et al.*, 2003; de Kretser *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001). Así, las inhibinas estimulan la producción de andrógenos regulando la expresión de genes esteroidogénicos y, al mismo tiempo, inhiben la producción de FSH (Sawetawan *et al.*, 1996). De forma opuesta, la activina, TGF- β y las BMPs inhiben la expresión de CYP17 y la producción de andrógenos en células tecales (Dooley *et al.*, 2000; Sawetawan *et al.*, 1996). En este sentido, se ha descrito que las pacientes con PCOS muestran niveles bajos de activina A, acompañados de niveles elevados de folistatina, inhibina B y AMH, en comparación con mujeres controles (Norman *et al.*, 2001b; Pigny *et al.*, 2000; Pigny *et al.*, 2003). Además de disminuir la producción de andrógenos, la activina A promueve proliferación de células de la granulosa, la secreción de FSH y el crecimiento del folículo ovárico (Li *et al.*, 1995; Smits *et al.*, 1998). Por el contrario, la folistatina inhibe la acción de las activinas (de Kretser *et al.*, 2002), de modo que el aumento en su expresión en mujeres con

PCOS puede estar relacionado con la inhibición de la maduración folicular y con la entrada en atresia (Shen *et al.*, 2005).

1.2.2.3. Alteraciones en la esteroidogénesis adrenal en el PCOS

Numerosos trabajos muestran la existencia de una actividad adrenal aumentada en el PCOS (Doi *et al.*, 2005), incluyendo disfunciones en la esteroidogénesis adrenal que contribuyen al exceso androgénico de las mujeres afectadas por el síndrome. Así, se ha descrito que la mitad de las pacientes con hiperandrogenismo y el 25-50% de las mujeres con PCOS presentan una producción elevada de andrógenos adrenales (Moran & Azziz, 2001), reflejada por el aumento en precursores de DHEA y 11 β -hidroxi-androstenediona en el plasma de mujeres con PCOS (Ehrmann *et al.*, 1992; Hudson *et al.*, 1990).

Aunque no se conocen bien los mecanismos responsables de las anomalías adrenocorticales en el PCOS, las evidencias indican que el eje ovárico-adrenal presenta un papel clave en la fisiopatología del PCOS. Así, se ha descrito que las niñas con adrenarquia prematura tienen un riesgo elevado a desarrollar PCOS durante la pubertad (Ibanez *et al.*, 2000). Los mecanismos de hiperandrogenemia adrenal pueden tener origen en desregulaciones de las enzimas esteroidogénicas, de manera homóloga a lo que estaría ocurriendo en el ovario, tal como se ha observado en el caso de la enzima P450c17 (Gonzalez *et al.*, 1996). En la glándula adrenal, el aumento de IGFs, de insulina o de ambas moléculas amplifica la expresión de P450c17 mediada por ACTH y, por tanto, aumenta la síntesis de andrógenos adrenales (Kristiansen *et al.*, 1997; Mesiano *et al.*, 1997). La regulación de la esteroidogénesis adrenal asimismo viene determinada por la acción de otros factores como β -endorfinas, prolactina y hormona del crecimiento, e incluso algunos factores ováricos como las inhibinas (Doi *et al.*, 2005; Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998).

1.3. RESISTENCIA INSULÍNICA Y ANOMALÍAS METABÓLICAS EN EL PCOS.

Las anomalías reproductivas del PCOS van acompañadas con frecuencia de alteraciones metabólicas, incluyendo insulinoresistencia y su hiperinsulinemia compensatoria, obesidad, hipertensión, intolerancia a la glucosa y diversos factores de riesgo cardiovascular como dislipidemia, alteraciones de la fibrinólisis, disfunción endotelial, niveles elevados de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) y aterosclerosis (Reaven, 2005). Este perfil metabólico recuerda

al síndrome metabólico, aunque la etiología de ambas patologías parece ser diferente (Legro, 2003).

Numerosas evidencias indican que la resistencia a insulina y la hiperinsulinemia presentan un papel central en la patogénesis del hiperandrogenismo y del PCOS (Tsilchorozidou *et al.*, 2004). Así, los síndromes de resistencia insulínica severa se caracterizan por la presencia de hiperandrogenismo cuando aparecen en mujeres premenopáusicas (Dunaif, 1997). La hiperinsulinemia, derivada de un estado de resistencia a insulina en distintos tejidos, como músculo esquelético, tejido adiposo e hígado, contribuye al exceso androgénico mediante varios mecanismos independientes (Figura 1.2). A nivel de la esteroidogénesis, la insulina e IGFs estimulan la producción ovárica y adrenal de andrógenos al incrementar la respuesta androgénica de las células teca y adrenales a la estimulación por LH y ACTH (Dunaif, 1997) y la expresión o la actividad de enzimas esteroidogénicas (Qin & Rosenfield, 1998). A nivel neuroendocrino, la insulina interfiere en la regulación hipotalámica de la secreción de gonadotropinas, favoreciendo la secreción de LH (Legro & Strauss, 2002). Además, reduce la producción hepática de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y de la proteína de unión a IGF de tipo 1 (IGFBP1, *IGF-binding protein 1*), conduciendo a una mayor disponibilidad de testosterona e IGF1 libres en los tejidos diana (Nestler *et al.*, 1991; Tsilchorozidou *et al.*, 2004).

1.3.1. Rutas de señalización de la insulina y resistencia a insulina.

La insulina, una hormona polipeptídica secretada por las células β del páncreas, presenta un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Sus principales dianas son el hígado, el músculo y el tejido adiposo. En el hígado, la insulina promueve el almacenamiento de glucógeno inhibiendo la gluconeogénesis y glucogenolisis, mientras que en músculo y tejido adiposo estimula la captación de glucosa periférica e inhibe la lipólisis.

La acción de la insulina se inicia cuando se une a su receptor en la superficie celular (Figura 1.4). El receptor de insulina (IR) pertenece a la familia de receptores tirosín-quinasa que incluye receptores para otros factores de crecimiento y para citoquinas (Dunaif, 1997). Es una proteína heterotetrámerica formada por dos dímeros α - β unidos por puentes disulfuros. Las subunidades α son extracelulares y contienen el dominio de unión a ligando, mientras que las subunidades β atraviesan la membrana y contienen un dominio con actividad tirosín-quinasa. La unión de la insulina a las subunidades α conduce a autofosforilación en residuos específicos de tirosina, y con ello, al incremento en la actividad tirosín-quinasa intrínseca

(Saltiel & Kahn, 2001). Seguidamente, se fosforilan sustratos intracelulares específicos que inician la cascada de transducción de señal. Se han descrito dos rutas independientes en la señalización de insulina que actúan de forma concertada para promover la translocación del transportador de glucosa dependiente de insulina, GLUT4, a la membrana plasmática y, con ello, la captación de glucosa: i) una mediada por las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS), la enzima fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y PKB/Akt; y ii) una ruta alternativa mediada por la fosforilación de c-Cbl y la posterior activación de TC10 (Saltiel & Pessin, 2003). Además de esta acción, la insulina modula numerosos procesos, tanto metabólicos mediante la ruta de PI3K, como mitogénicos a través de la ruta de las proteínas MAP-quinasas, favoreciendo la proliferación y la supervivencia celular.

La resistencia a insulina tiene origen en alteraciones en la señalización que conduzcan a una menor captación de glucosa por las células. Así, se han descrito numerosos mecanismos implicados, tanto a nivel de activación de la cascada de señalización, incluyendo alteraciones en la fosforilación del receptor, en la posterior activación de la actividad tirosín-quinasa o en la fosforilación de proteínas IRS; como a nivel de los procesos de atenuación de la señal, incluyendo la modulación de la actividad tirosín-quinasa del receptor por la glicoproteína PC-1 (*Plasma cell differentiation factor-1*), el aumento de fosforilación en residuos Ser en el receptor y en proteínas IRS y el incremento de la actividad de proteínas tirosín-fosfatasa, como PTP1B (Maddux & Goldfine, 2000)

1.3.2. Mecanismos moleculares de resistencia a insulina en el PCOS.

Se ha descrito que la insulinoresistencia en el PCOS se produce de forma independiente a la obesidad (Dunaif *et al.*, 2001), pues las mujeres afectadas, tanto obesas como delgadas, presentan menor sensibilidad a la insulina cuando se comparan con mujeres control de la misma edad y peso (Dunaif *et al.*, 1989; Marsden *et al.*, 2001). Estas observaciones clínicas han sido confirmadas a nivel molecular con el estudio *in vitro* de la acción de la insulina en adipocitos de pacientes con PCOS. Así, estos adipocitos presentan una marcada disminución en la sensibilidad a la insulina, en el transporte de glucosa estimulado por insulina y en la abundancia de GLUT4 (Ciaraldi *et al.*, 1992; Venkatesan *et al.*, 2001). Se han obtenido resultados similares en otros tipos celulares, incluyendo miocitos, fibroblastos y células endometriales (Dunaif *et al.*, 2001; Dunaif *et al.*, 1995).

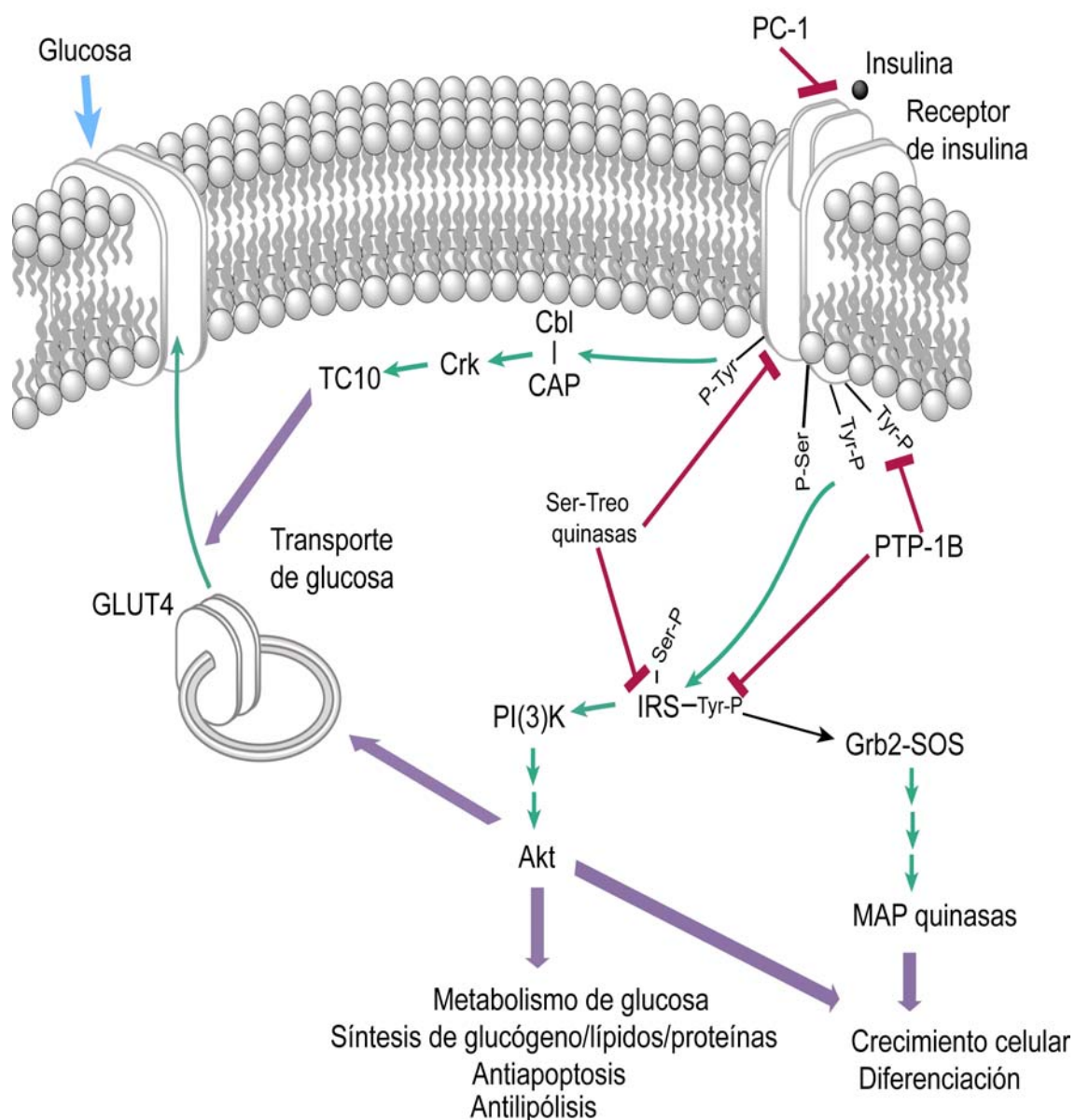


Figura 1.4. Rutas de señalización y acción de la insulina. Tras la unión con insulina, el receptor de insulina, con actividad tirosina-quinasa intrínseca, se activa por autofosforilación y cataliza la fosforilación de distintas proteínas, incluyendo IRS y Cbl. Tras la fosforilación en residuos de tirosina, estas proteínas interactúan con moléculas señalizadoras a través de sus dominios SH2, activándose distintas rutas de transducción de señal. Estas rutas actúan de forma coordinada para regular el tráfico de vesículas, la síntesis de proteínas, activación/inactivación de enzimas y de la expresión génica, mecanismos que conducen a la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas, así como del crecimiento y diferenciación celular.

En los pacientes con PCOS, se produce una atenuación de la señalización de la insulina como consecuencia de la existencia de alteraciones a varios niveles de la ruta de transducción (Dunaif, 1997). A nivel del receptor de insulina, se ha descrito que la disminución de la autofosforilación en residuos tirosina, acompañada de una fosforilación constitutiva en residuos serina en la subunidad β , conduce a una menor activación de la actividad tirosín-quinasa intrínseca del receptor (Dunaif *et al.*, 1995). Estas anomalías en la fosforilación de

residuos serina en el receptor de insulina parecen ser características del PCOS, pues no están presentes en otros estados de resistencia a insulina, como obesidad y DMT2. Recientes estudios han demostrado que el tratamiento con inhibidores de serín-quinasa normaliza la autofosforilación del receptor de insulina, sugiriendo que en este mecanismo está implicada una actividad serín-quinasa extrínseca al receptor, sin que hasta el momento haya podido ser identificada (Li *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha postulado que este factor extrínseco podría venir determinado genéticamente, lo que estaría de acuerdo con las observaciones en estudios familiares que concluyen que la resistencia a insulina es un defecto genético en el PCOS (Legro *et al.*, 1998c; Norman *et al.*, 1996). A nivel de post-receptor, numerosos trabajos describen defectos intrínsecos o adquiridos en la activación de proteínas señalizadoras de la insulina en distintos tipos celulares procedentes de mujeres con PCOS, incluyendo a IRS-1, IRS-2 y PI3K (Corbould *et al.*, 2005; Dunaif *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2000). Así, entre otros mecanismos, se ha descrito la fosforilación constitutiva del residuo Ser312 en la proteína IRS1 en células musculares de estas pacientes (Corbould *et al.*, 2005).

Se piensa que los defectos en la señalización de insulina en el PCOS producen una resistencia selectiva a la insulina, afectando a las acciones metabólicas de la insulina pero no a sus acciones mitogénicas (Book & Dunaif, 1999; Wu *et al.*, 2003). En este sentido, a pesar de la insulinoresistencia en tejidos periféricos (hígado, músculo y tejido adiposo), el ovario de las mujeres con PCOS muestra sensibilidad a la insulina, tal como se refleja en varios estudios *in vitro* (Nestler *et al.*, 1998; Willis *et al.*, 1996). Así, se ha descrito que en las células de la teca de estas mujeres la insulina estimula la esteroidogénesis a través de su propio receptor de forma sinérgica con la LH (Willis *et al.*, 1996). Se ha propuesto que en el PCOS se activa una ruta de señalización alternativa en donde parece estar implicada la formación de inositol glicanos como segundos mensajeros, de forma independiente a la activación de la actividad tirosín-quinasa del receptor de insulina (Nestler *et al.*, 1998). Recientemente, se ha descrito que los defectos selectivos de la acción de la insulina también afectan a las células de la granulosa, con resistencia sobre las ruta metabólicas y aumento en la actividad mitogénica (Wu *et al.*, 2003). La observación de que las rutas de señalización de la insulina pueden expresar actividades diferenciales bajo diferentes circunstancias apoya la posibilidad de un defecto selectivo sobre la ruta androgénica de la insulina en mujeres con PCOS, reflejado por una hipersensibilidad ovárica a la insulina (Baillargeon & Nestler, 2006).

1.3.3. Asociación entre resistencia a insulina e hiperandrogenemia.

Dada la correlación clínica entre exceso androgénico y resistencia a insulina, se ha postulado la hipótesis de que los defectos en la acción de la insulina pueden ser factores primarios en el PCOS. Apoyando esta teoría, se ha observado que los signos hiperandrogénicos y las funciones reproductivas mejoran en mujeres con PCOS tras seguir un tratamiento que aumente la sensibilidad a la insulina, como la administración de drogas antidiabéticas como metformina o tiazolidinedionas (Baillargeon *et al.*, 2004; Ehrmann *et al.*, 1997a; Ehrmann *et al.*, 1997b) y la pérdida de peso en pacientes obesas (Escobar-Morreale *et al.*, 2005a; Norman *et al.*, 2002); por el contrario, el tratamiento con agentes antiandrógenos no restaura la sensibilidad a la insulina (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 1995). Además, los defectos en la acción de la insulina persisten a lo largo del cultivo *in vitro* de diferentes tipos celulares de mujeres con PCOS (Corbould *et al.*, 2005; Dunaif, 1997).

Sin embargo, la hiperinsulinemia no explica todas las alteraciones presentes en el PCOS pues, ni todas las mujeres con resistencia a insulina desarrollan el síndrome, ni la mejora de la sensibilidad a la insulina normaliza todos los síntomas del PCOS, ni la disminución en los niveles de insulina afecta a los andrógenos circulantes en mujeres normales. Todo ello parece indicar que es necesaria la existencia de defectos intrínsecos en los ovarios que aumenten la sensibilidad a la estimulación de la esteroidogénesis por insulina en las mujeres con PCOS (Baillargeon & Nestler, 2006).

1.4. ESTUDIOS GENÉTICOS EN EL PCOS.

Aunque numerosos estudios sobre la patogénesis del PCOS han evidenciado la participación de factores genéticos, poco se conoce sobre los genes responsables de la etiología del PCOS. Los estudios genéticos en el PCOS se ven dificultados por diversas limitaciones asociadas a las características del síndrome. Primero, el PCOS se diagnostica a mujeres en edad reproductiva, de modo que no es sencillo asignar fenotipos en adolescentes y en mujeres post-menopáusicas, a lo que hay que añadir la ausencia de un fenotipo masculino reconocido (Legro, 2000; Starka *et al.*, 2005). Asimismo, el hecho de que el PCOS esté asociado a infertilidad complica la obtención de familias con más de una generación y varios miembros afectados, lo que es necesario para los estudios de ligamiento genético (Legro & Strauss, 2002). Por todas estas causas, en el estudio genético del PCOS, se han utilizado preferentemente otras aproximaciones como estudios caso-control, donde se

estudian genes o regiones candidatas para el PCOS utilizando individuos afectados (casos) y controles no relacionados de la misma población. Estos estudios tampoco están exentos de limitaciones, pues la heterogeneidad de los síntomas y la falta de criterios de diagnóstico universalmente aceptados dificultan la obtención de poblaciones homogéneas, que presenten un tamaño muestral adecuado para minimizar los falsos negativos, y asimismo que permitan la comparación de los resultados entre trabajos independientes.

Aunque existe la evidencia de agrupamiento familiar en el PCOS, hasta el momento no se ha podido establecer un patrón de herencia mendeliana. Distintos estudios de ligamiento genético sugieren un modelo de herencia autosómico dominante (Carey *et al.*, 1993; Govind *et al.*, 1999; Legro *et al.*, 1998a), o con patrón ligado al cromosoma X (Givens, 1988); sin embargo estas teorías no han sido confirmadas por otros trabajos (Kahsar-Miller *et al.*, 2001; Norman *et al.*, 1996). La heterogeneidad fenotípica de los pacientes, incluso dentro de una misma familia, hace improbable la implicación de un único defecto genético. Por tanto, actualmente está aceptado que el PCOS es un desorden genético complejo que puede ser explicado por la interacción de un número no definido de genes de susceptibilidad (Jahanfar *et al.*, 1997).

Más de 50 genes han sido estudiados por su relación con la fisiopatología del PCOS, incluyendo genes relacionados con la síntesis y acción de andrógenos, la acción y regulación de gonadotropinas, la acción de la insulina, la insulinoresistencia, la regulación de la energía, y la inflamación crónica (Roldan *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios han evaluado la asociación entre el PCOS o sus fenotipos asociados con variantes alélicas en genes candidatos mediante estudios caso-control con el fin de valorar correlaciones entre genotipo-fenotipo (Urbanek *et al.*, 2000). Los estudios de ligamiento han sido menos utilizados pues, además de las limitaciones de los estudios familiares en PCOS, su potencia estadística es menor cuando se aplican al estudio de enfermedades genéticas complejas (Roldan *et al.*, 2004). En general, tanto los análisis de ligamiento como los estudios de asociación han sido infructuosos en la búsqueda de genes de susceptibilidad en el PCOS, dado que muy pocos de los posibles genes candidatos han podido ser confirmados en dos o más estudios independientes (Luque-Ramirez *et al.*, 2006).

Entre todos los genes estudiados por su implicación en la síntesis y acción de hormonas esteroideas, los genes CYP11A, CYP17 y el receptor de andrógenos (AR), son los únicos que muestran una asociación significativa con el PCOS. Varios estudios de asociación realizados con el polimorfismo (TTTA)_n en el promotor del gen CYP11A, que codifica para la enzima P450_{scc}, muestran asociación significativa al PCOS y a niveles de testosterona totales tanto

en estudios familiares como en estudios caso-control (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2000; Gharani *et al.*, 1997; Urbanek *et al.*, 1999), lo que sugiere un posible papel de este polimorfismo de tipo VNTR en la patología del PCOS. Sin embargo, otros estudios recientes realizados en una población de mayor tamaño no han podido confirmar este papel, indicando que la asociación de los alelos VNTR en el gen CYP11A con el PCOS puede estar sobreestimada en los trabajos anteriores (Gaasenbeek *et al.*, 2004). Aunque se ha descrito la asociación entre el PCOS con el polimorfismo -34T/C en el promotor de CYP17 (Carey *et al.*, 1994; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 1999), la mayoría de los trabajos abogan por la ausencia de tal asociación, descartando dicho gen como candidato genético para el PCOS (Gharani *et al.*, 1996; Liovic *et al.*, 1997; Marszalek *et al.*, 2001; Techatrasak *et al.*, 1997). En el caso del gen AR, se ha descrito la asociación inversa entre el número de repeticiones del VNTR (CAG)_n en el exón 1 con anovulación y niveles de testosterona en mujeres con PCOS (Mifsud *et al.*, 2000). Sin embargo, no existen evidencias de ligamiento genético entre AR y PCOS en estudios de agregación familiar (Urbanek *et al.*, 1999).

En base a las crecientes evidencias que recalcan la importancia de la resistencia a insulina en el desarrollo del PCOS, se han estudiado como posibles candidatos para el PCOS numerosos genes implicados en la acción de la insulina. Así, se ha descrito el ligamiento del PCOS a un polimorfismo VNTR en el gen de la insulina en varios estudios familiares (Eaves *et al.*, 1999; Michelmores *et al.*, 2001; Waterworth *et al.*, 1997), aunque existen discrepancias con los resultados obtenidos en otros trabajos (Urbanek *et al.*, 1999; Vankova *et al.*, 2002), probablemente debido a las limitaciones, anteriormente descritas, en los estudios genéticos en el PCOS y a diferencias en el genotipado del VNTR. Asimismo, los alelos de tipo III para este polimorfismo se han visto asociados significativamente al PCOS, especialmente en pacientes con disfunciones menstruales (Waterworth *et al.*, 1997). En los últimos años, se han descrito asociaciones significativas entre parámetros de la acción de la insulina en mujeres con PCOS y las variantes alélicas Gly972Arg y Gly1057Asp en los genes IRS-1 e IRS-2, respectivamente (Ehrmann *et al.*, 2002b; El Mkaem *et al.*, 2001; Ibanez *et al.*, 2002; Villuendas *et al.*, 2005). Si estas asociaciones se confirmasen en otras poblaciones, estos polimorfismos, solos o en combinación, podrían explicar en parte la insulinoresistencia en el PCOS.

Varios trabajos han definido la existencia de una región candidata al PCOS en el cromosoma 19p13.2, cerca del locus para el gen del receptor de insulina (INSR) (Tucci *et al.*, 2001; Urbanek *et al.*, 1999; Urbanek *et al.*, 2005). Existen evidencias de asociación y ligamiento del marcador D19S884, localizado a una distancia de 800kb del gen INSR, con

PCOS e hiperandrogenismo (Tucci *et al.*, 2001; Urbanek *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha descrito la asociación significativa de varios polimorfismos en el gen INSR con el PCOS (Jin *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2002), por lo que no se puede descartar la posibilidad de que el gen INSR pueda ser un gen candidato para el PCOS, ni tampoco que otros genes próximos a este *locus* puedan contribuir en la patogénesis del PCOS. Éste es el caso del gen de la resistina (RETN), una citoquina secretada por los adipocitos, que parecía ser un candidato ideal para el PCOS debido a su implicación en el desarrollo de resistencia a insulina (Steppan *et al.*, 2001); sin embargo no se han encontrado evidencias de asociación entre variantes del gen RETN con hiperandrogenemia, obesidad y resistencia a insulina en familias con PCOS (Urbanek *et al.*, 2003).

A la vista de que el tratamiento con agonistas de PPAR- γ , como las tiazolidinedionas, mejora la resistencia a insulina y el hiperandrogenismo en las pacientes con PCOS (Dunaif *et al.*, 1996), varios estudios se han centrado en la posible asociación del PCOS con distintas variantes alélicas en el gen PPAR- γ 2. A pesar de la falta de ligamiento de marcadores cercanos a dicho gen en familias con PCOS (Urbanek *et al.*, 1999), varios estudios de asociación han demostrado que existe una asociación significativa del PCOS con el polimorfismo Pro12Ala el gen PPAR- γ 2 (Hara *et al.*, 2002; Korhonen *et al.*, 2003; Orio *et al.*, 2003). En los últimos años, se ha postulado un posible papel en la patología del PCOS de las calpaínas, unas cisteín-proteasas que intervienen en la secreción y acción de la insulina. Así, se ha descrito que la combinación de haplotipos 112/121 de los polimorfismos UCSNP-43, UCSNP-19 y UCSNP-63 para el gen CAPN10 dobla el riesgo a sufrir PCOS (Ehrmann *et al.*, 2002a). Además, otros estudios han descrito asociaciones significativas entre el PCOS y distintos polimorfismos de CAPN10 y CAPN5, así como la influencia de distintos haplotipos en estos genes con hipercolesterolemia e hiperandrogenismo en pacientes con PCOS (Gonzalez *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2006a; Haddad *et al.*, 2002).

Las múltiples manifestaciones fenotípicas del PCOS indican que su etiología debe ser multifactorial como resultado de la interacción de componentes no genéticos durante el desarrollo fetal, la infancia o la pubertad, con variantes genómicas de susceptibilidad a exceso androgénico, insulinoresistencia e inflamación crónica (Cresswell *et al.*, 1997; Escobar-Morreale *et al.*, 2005b; Franks *et al.*, 2006). En esta patología, podrían estar participando variantes alélicas protectoras en distintos genes, puesto que muchos de los polimorfismos asociados al PCOS son comunes en la población, asociándose la enfermedad al alelo silvestre (Roldan *et al.*, 2004). Estas observaciones, junto a la alta prevalencia del PCOS y del síndrome

metabólico en los países desarrollados, han dado lugar al planteamiento de una nueva hipótesis sobre la etiología del PCOS basada en la posible ventaja de las variantes genómicas asociadas a fenotipos hiperandrogénicos, insulinoresistentes y obesos a lo largo de la evolución (Escobar-Morreale *et al.*, 2005b; Fernandez-Real & Ricart, 1999).

1.5. ESTUDIOS GENÓMICOS EN EL PCOS.

El reciente desarrollo de la bioinformática y de técnicas de alto rendimiento para el análisis de la expresión de miles de genes o proteínas ha sido el artífice de la transformación de la Biología Molecular en los últimos años. Actualmente, el estudio de los procesos biológicos ha pasado de centrarse en el estudio individualizado de las funciones biológicas de unos pocos genes o proteínas, a una investigación con un enfoque más global del problema biológico. Las técnicas de genómica funcional no sólo se centran en la identificación de la función de los genes y sus productos, sino además en conocer como éstos interaccionan durante el desarrollo de distintos procesos normales o patológicos; por tanto, parecen apropiadas para el estudio de enfermedades poligénicas (Glazier *et al.*, 2002). En los últimos años, ha aumentado el número de trabajos que aplican estas técnicas al estudio de enfermedades complejas distintas del cáncer, entre otras, obesidad, diabetes, enfermedad de Alzheimer, asma y enfermedades autoinmunes (Blalock *et al.*, 2004; Burczynski *et al.*, 2006; Hakonarson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Patti *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2003)

Con respecto al PCOS, sólo tres trabajos han aplicado técnicas de *microarrays* de ADN al estudio de las bases moleculares del PCOS en tejido ovárico (Diao *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2004) y en células tecaes en cultivo (Wood *et al.*, 2003), lo que ha permitido la identificación de genes con expresión diferencial en pacientes con respecto a controles. Estos trabajos han destacado procesos moleculares que podrían estar alterados en el ovario de las mujeres con PCOS, como la biosíntesis de ácido retinoico, la ruta de señalización de Wnt o rutas de apoptosis y supervivencia celular. Entre los genes diferencialmente expresados en células tecaes de pacientes con PCOS, destaca el aumento de expresión para el factor transcripcional GATA6 (Wood *et al.*, 2003). Estudios funcionales *in vitro* han demostrado que GATA-6 es un activador transcripcional de los genes CYP17 y CYP11 en células tecaes, lo que evidencia un posible papel de GATA6 en la fisiopatología del PCOS. Aunque se ha demostrado el aumento en la expresión y en la estabilidad del ARNm de GATA6 en pacientes con PCOS, no se han encontrado variantes alélicas que expliquen estas alteraciones ni en el promotor ni en la secuencia codificante de este gen (Ho *et al.*, 2005).

Estos trabajos corroboran que las técnicas de genómica pueden ser una alternativa a los análisis genéticos tradicionales tanto en el estudio de la fisiopatología como en la búsqueda de genes candidatos para el PCOS. Sin embargo, el estudio del PCOS mediante estas técnicas se ve limitado por la dificultad para obtener un número de biopsias ováricas adecuado para los estudios de expresión. Hasta hace algunos años, era habitual en el tratamiento del PCOS que se llevaran a cabo resecciones en los ovarios con el fin de reducir la masa ovárica y, con ello, la producción androgénica; así se paliaban de forma transitoria algunos de los síntomas de la patología. En la actualidad, esta práctica está en desuso, de modo que la obtención de biopsias ováricas se ve muy restringida.

El PCOS es un desorden complejo que no se encuentra limitado a las disfunciones ováricas sino que presenta una afectación sistémica con alteraciones, entre otras, a nivel de las acciones metabólicas de la insulina en tejidos periféricos (Venkatesan *et al.*, 2001). Dado el importante papel que ejerce el tejido adiposo, principalmente con localización abdominal, en el desarrollo de la obesidad, resistencia a insulina y dislipidemia (Lewis *et al.*, 2002), y la frecuente asociación de obesidad y PCOS, parece evidente la implicación de dicho tejido en el desarrollo del PCOS (Carmina *et al.*, 2005b). En este sentido, varios trabajos han puesto de manifiesto que en el PCOS se producen alteraciones en distintas funciones del tejido adiposo, entre ellas, en la regulación del metabolismo lipídico (Arner, 2005; Ek *et al.*, 2002; Faulds *et al.*, 2003), regulación de la sensibilidad de la insulina (Ciaraldi *et al.*, 1992; Ciaraldi *et al.*, 1997), y en la producción de hormonas y citoquinas, incluyendo leptina, resistina, adiponectina y grelina (Carmina *et al.*, 2006; Munir *et al.*, 2005; Seow *et al.*, 2004; Spranger *et al.*, 2004; Wasko *et al.*, 2004). Por tanto, si el fenotipo PCOS desencadena alteraciones en el tejido adiposo, éstas se pueden estar manifestando a nivel de la expresión génica en las pacientes con este síndrome. Con este planteamiento, en este trabajo se presenta un análisis comparativo del perfil transcripcional del tejido adiposo omental entre mujeres con PCOS y controles, mediante el uso de *microarrays* de oligonucleótidos.

A pesar del desarrollo en los últimos años de diversas técnicas para el estudio a gran escala de la expresión proteica, hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún estudio proteómico en el PCOS. Por ello, en este trabajo de tesis doctoral hemos considerado interesante no sólo utilizar estrategias genómicas sino también proteómicas para obtener una visión más global e integrada de los procesos biológicos alterados en esta patología.

2. OBJETIVOS

El síndrome de ovario poliquístico es una patología genética compleja de la que se desconocen los genes implicados en su desarrollo. Estudios previos han puesto de manifiesto que existen alteraciones en la acción de la insulina, la lipólisis y la producción de citoquinas en el tejido adiposo en pacientes con PCOS. Estas evidencias indican que dicho tejido, principalmente con localización abdominal, podría desempeñar un papel aún no definido en el desarrollo de las anomalías endocrinas y metabólicas del PCOS. Por ello, este trabajo de Tesis Doctoral se ha dirigido hacia la búsqueda de las posibles alteraciones moleculares en el tejido adiposo que pudieran contribuir en la fisiopatología del PCOS, planteando este estudio desde un punto de vista genómico, transcriptómico y proteómico, con los objetivos que se enumeran a continuación:

1. Identificación de genes de susceptibilidad al PCOS mediante estudios de asociación caso-control.
2. Identificación de genes expresados diferencialmente en el tejido adiposo omental de pacientes con PCOS en comparación con mujeres no hiperandrogénicas mediante la aplicación de las técnicas de *microarrays* de ADN y PCR a tiempo real.
3. Identificación de rutas metabólicas alteradas en el tejido adiposo omental en pacientes con PCOS.
4. Identificación de proteínas con diferencias en su patrón de expresión en el tejido adiposo omental de pacientes con PCOS en comparación con mujeres control mediante análisis proteómico comparativo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS Y MATERIALES DE ESTUDIO.

Todos los individuos incluidos en este trabajo fueron diagnosticados por el Dr. Héctor Escobar-Morreale del Servicio de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal, Madrid, quien nos ha proporcionado las muestras para este estudio. Ninguno de los individuos participantes estuvo en tratamiento hormonal o farmacológico, incluyendo la píldora anticonceptiva o fármacos antiobesidad, durante los últimos seis meses anteriores a su reclutamiento para este trabajo. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los individuos y el protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal.

El PCOS se diagnosticó por la presencia de oligovulación y de hiperandrogenismo clínico o bioquímico, junto con la exclusión de hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congénita y tumores secretores de andrógenos (Azziz *et al.*, 2006; Zawadzki, 1992). La evidencia de oligovulación viene determinada por oligomenorrea crónica o por niveles de progesterona en fase lútea inferiores a 4 ng/ml en los pacientes con menstruaciones regulares. El grado de hirsutismo se cuantificó mediante el índice de Ferriman-Gallwey modificado (Azziz *et al.*, 2006; Hatch *et al.*, 1981). Los estudios hormonales y bioquímicos fueron realizados durante los días 5-10 del ciclo menstrual o durante amenorrea en las pacientes con disfunciones menstruales. En los análisis hormonales y bioquímicos se incluyó la determinación de los niveles circulantes de glucosa, insulina, prolactina y 17-OHP, así como de los niveles basales de testosterona total, androstenediona, DHEAS y SHBG, siguiendo los protocolos previamente descritos (Asuncion *et al.*, 2000; Escobar-Morreale *et al.*, 1997). La resistencia a insulina en estado de ayunas se estimó con los niveles de glucosa e insulina utilizando el índice de resistencia a insulina (Bastard *et al.*, 1997) y el índice HOMA-IR (Matthews *et al.*, 1985). El grado de obesidad se determinó por el índice de masa corporal (IMC), definido como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros. Un IMC ≥ 30 kg/m² indica obesidad y si el IMC es mayor o igual a 40 kg/m², la obesidad se define como mórbida.

En los estudios de asociación caso-control se utilizó una población formada por mujeres con PCOS (*casos*) y mujeres no afectadas (*controles*), incluyendo mujeres voluntarias delgadas y pacientes remitidas al citado Servicio de Endocrinología para recibir tratamiento contra la obesidad. Las mujeres control no presentan disfunciones menstruales, historial de infertilidad o síntomas de hiperandrogenismo. Se obtuvo ADN genómico de los individuos participantes a partir sangre periférica utilizando los kits comerciales de purificación de ADN *Wizard genomic DNA purification kit* de Promega y *Nucleon BAC C3* de GE Healthcare. La preparación

del ADN se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. José Luis San Millán en el Departamento de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal.

En el análisis de la expresión diferencial de genes y proteínas en tejido adiposo se empleó una población de estudio formada por mujeres con obesidad mórbida, todas ellas sometidas a cirugía bariátrica como tratamiento de la obesidad. La evaluación clínica y los estudios hormonales y bioquímicos, dirigidos al diagnóstico específico de PCOS, se realizaron de forma previa a la intervención quirúrgica. Durante la cirugía se obtuvieron biopsias de tejido adiposo omental, también llamado visceral, las cuales fueron lavadas con solución salina fría al 0.9% tras su extracción y congeladas en nitrógeno líquido. Se conservaron a -70 °C hasta el momento de ser utilizadas.

3.2. ESTUDIOS CASO-CONTROL.

Se analizó la posible asociación del PCOS con 6 polimorfismos de tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), localizados en 4 genes candidatos previamente relacionados con resistencia a insulina, DMT2 u obesidad. La tabla 2.1 muestra un resumen con los polimorfismos estudiados en este trabajo: 1) la transición T→C en el codón -108 en el gen de la paroxonasa (PON1); 2) dos cambios conservativos en los codones 45 (T→G) y 276 (G→T) en el gen de la Adiponectina; 3) la inserción de G en el codón 1484 y la transición C→T en el codón 981 en el gen para la proteína tirosín-fosfatasa 1B (PTP1B); y 4) el polimorfismo -675 4G/5G en el promotor del gen PAI-1.

Tabla 2.1. Marcadores polimórficos estudiados en genes candidatos para PCOS.

<i>Gen</i>	<i>Variante alélica</i>	<i>Tipo de mutación</i>	<i>Localización en gen</i>	<i>Referencia</i>
PON1	Gln192Arg (T-108C)	Sustitución no conservativa	exónica	(Humbert <i>et al.</i> , 1993)
Adiponectina	T45G	Sustitución sinónima	exónica	(Stumvoll <i>et al.</i> , 2002)
	G276T	Transversión	intrónica	(Hara <i>et al.</i> , 2002)
PTP1B	Ins1484G	Inserción	3'UTR	(Di Paola <i>et al.</i> , 2002)
	C981T	Transición	exónica	(Mok <i>et al.</i> , 2002)
PAI-1	-675 4G/5G	Inserción	promotor	(Hoffstedt <i>et al.</i> , 2002)

La población de estudio fue genotipada mediante un análisis de polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP). Los marcadores polimórficos estudiados provocan la pérdida o la ganancia en un sitio de restricción lo que genera un mapa de restricción único para cada genotipo. Las diferencias en la composición de nucleótidos se reflejan en el tamaño de los fragmentos de restricción tras su electroforesis en un gel de agarosa.

Las condiciones de las reacciones de PCR, los cebadores y las endonucleasas de restricción utilizadas en el genotipado se detallan en la tabla 2.2. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 15 µl, utilizando 100 ng de ADN genómico, 200 µM de dNTPs, 10 pmoles de cada cebador y 1.25 U de la ADN polimerasa *Taq Gold* (Applied Biosystems) en tampón de reacción 1x con una concentración final de 1.5-2.5 mM de MgCl₂. Los productos de PCR se incubaron con la correspondiente enzima de restricción y el resultado de la digestión se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1-3% en TBE).

Tabla 2.2. Cebadores, condiciones de PCR, tamaños de los amplicones y endonucleasa utilizada

<i>Gen</i>	<i>Cebadores</i>	<i>Tª†</i>	<i>Tamaño (pb)</i>	<i>Endonucleasa</i>
PON1				
T-180C	Directo: 5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3' Reverso: 5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC-3'	64°C	100 (60+40)	AlwI
Adiponectina				
45 T→G	Directo: 5'-TCT CCA TGG CTG ACA GTG C-3'	61°C	439 (355+85)	AvaI
276 G→T	Reverso: 5'-GAG TGT AGA TGG TGC CTC TAT-3'		439 (315+120)	BsmI
PTP1B				
Ins1484G	Directo: 5'-TAC TCG ATG AGG CGA CAG CTC TGC-3' Reverso: 5'-GAC ACA CAT CCG GGG AAG ATG GG-3'	64°C	260 (99+166)	SacII
981 C→T	Directo: 5'-AAC CAG CCG AAG TGA ACA CTA ATA GG-3' Reverso: 5'-CCT AGA ACA GAA AGT CAT TTC CCC-3'	61°C	332 (93+239)	AvaI
PAI-1				
-675 4G/5G	Directo: 5'-CAC AGA GAG AGT CTG G <u>CC</u> ACG TG-3'* Reverso: 5'-CCA ACA GAG GAC TCT TGG TCT-3'	56°C	98 22+77)	BsII

† Tª de anillamiento de los cebadores utilizados durante la reacción de PCR.

* El nucleótido subrayado fue introducido durante el diseño del cebador para crear un sitio de restricción BsII.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 12.0, considerando p -valor ≤ 0.05 como el nivel de significancia estadística. Con el fin de asegurar la distribución normal de las variables, en los casos que así lo requirieron, los datos fueron transformados a escala logarítmica. Las variables continuas fueron analizadas con el estadístico de Kolmogorov-Smirnov. Se empleó un análisis de covarianza para comparar pacientes y controles corrigiendo frente a la diferencia de edad existente entre los dos grupos. La asociación estadística entre variables discontinuas se evaluó mediante el contraste de χ^2 y el test exacto de Fischer. La influencia de los diferentes genotipos en las variables clínicas y bioquímicas relacionadas con hiperandrogenismo y resistencia a insulina (niveles de testosterona, androstenediona, índice de hirsutismo, IMC, concentraciones de insulina, etc.) se analizó mediante una ANOVA de una vía.

Este trabajo se englobó dentro de un proyecto más amplio para la búsqueda de genes candidatos para PCOS dirigido por el Dr. José Luis San Millán y el Dr. Héctor Escobar-Morreale de los Departamentos de Genética Molecular y Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal, respectivamente.

3.3. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL.

3.3.1. Extracción de ARN.

Se extrajo ARN total a partir de 500 mg de tejido adiposo omental utilizando el reactivo TRIzol siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial (Invitrogene). Con el fin de eliminar ADN genómico y otros contaminantes que podrían interferir en el posterior proceso de hibridación, el ARN se purificó siguiendo el protocolo de limpieza del kit comercial *RNeasy Total RNA Isolation Kit* (Qiagen). El ARN se resuspendió en agua libre de RNAsas y se guardó a -70 °C hasta su uso. La integridad y concentración del ARN se valoraron mediante electroforesis en gel de agarosa (1% en TBE) y análisis en un bioanalizador (*Bioanalyzer* 2100, *RNA Assays*, Agilent Technologies), comprobando que la relación entre los picos de intensidad de los ARNs ribosomales 28S y 18S presentaba un valor próximo a 2.

3.3.2. Síntesis y marcaje del ARNc.

Se sintetizó ADNc a partir de 5 µg de ARN total previamente purificado utilizando el kit *SuperScript Choice System* (Invitrogene) según el protocolo recomendado por Affymetrix. En este proceso, se empleó como cebador el oligonucleótido (dT)₂₄ con la secuencia promotora de la ARN polimerasa T7 en extremo 3'. Seguidamente, se sintetizó ARNc marcado con biotina mediante una transcripción *in vitro* siguiendo el protocolo del kit *BioArray High Yield RNA Transcript Labelling T7* (Enzo). El ARNc se purificó con el kit *RNeasy Total RNA Isolation Kit* (Qiagen) y 20 µg del mismo se fragmentaron con un tratamiento alcalino a 94 °C durante 35 min. Posteriormente, se evaluó la calidad y cantidad de ARNc, tal como se describe en el apartado 3.3.1, para verificar que el proceso de fragmentación se haya realizado de forma homogénea.

3.3.3. Hibridación en los microarrays.

Se emplearon los *microarrays* de oligonucleótidos *GeneChip Human Genome U133A* (HG-U133A, Affymetrix) que contienen 21,722 sondas verificadas y contrastadas con la base de datos RefSeq del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI). Se eligió la tecnología de esta plataforma pues, en el momento de iniciarse este trabajo, era la que presentaba una mayor reproducibilidad en comparación con otros sistemas de expresión génica de alto rendimiento, tales como los *microarrays* de ADNc o los *macroarrays* en membrana de nylon. Los *microarrays* de Affymetrix se diferencian de otras plataformas en la fabricación y en el diseño de los *arrays*, así como en el análisis de los datos. Estos *microarrays* utilizan oligonucleótidos de 25 pares de bases que se sintetizan *in situ* sobre un soporte rígido mediante técnicas fotolitográficas, semejantes a las empleadas para la fabricación de microprocesadores. A diferencia de los *microarrays* de ADNc, donde las dos muestras a comparar se marcan diferencialmente con distintos fluorocromos y se hibridan en un mismo soporte, en la tecnología de Affymetrix, en cada *array* se hibrida una única muestra marcada previamente con biotina. Posteriormente, se realiza una incubación con estreptavidina conjugada al fluorocromo ficoeritrina. Por tanto, los valores de intensidad de las muestras a comparar se obtienen por separado.

Cada *microarray* se hibridó durante 16h a 45°C con 15 µg del ARNc fragmentado. A la mezcla de hibridación se añadieron controles internos (50 pM de oligo B2, 1.5 pM de *bio-B*, 5 pM *bio-C*, 25 pM *bio-D* & 100 pM *Cre-x*) con el fin evaluar la eficiencia de la hibridación y la sensibilidad del método de detección. Los procesos de hibridación, lavado y tinción se llevaron a cabo en

una estación fluidica automatizada (*Affymetrix Fluidics Station 400*) siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. A continuación, los *chips* se escanearon a una resolución de 3 μm en el escáner *HP G2500A GeneArray* (Agilent Technologies).

Con el fin de asegurar la calidad tanto del marcaje del ARNc como del ensayo de hibridación, de forma previa a la definitiva hibridación con las muestras, se testaron 5 μg de cada uno de los ARNc en el Test3Array (Affymetrix), constituido por 156 sondas que representan genes de diversos organismos eucariotas.

El marcaje de los ARNc y la hibridación de los *microarrays* se realizaron en colaboración con el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid)

3.3.4. Análisis de la imagen y normalización.

El programa informático *Microarray Suite* 5.0 (MAS 5.0) de Affymetrix fue utilizado para procesar la imagen obtenida durante la lectura del escáner, y para calcular la intensidad de señal de cada sonda en el *array*. Además, se normalizaron los niveles de señal con el fin de corregir las intensidades, eliminando las posibles diferencias debidas a la variación experimental, como diferencias en las condiciones de hibridación y lavado, la eficiencia de la tinción, el marcaje, el escaneado o la potencia del láser (Knudsen, 2002). Como se esperaba que, de forma global, los cambios de expresión entre las distintas muestras no fueran muy grandes y que sólo cambiase un número pequeño de transcritos, se utilizó un método de escalado global, que considera que la intensidad media de las sondas entre todos los *microarrays* debe ser similar.

Los algoritmos de sustracción y normalización de la señal del programa MAS 5.0 están basados en el diseño de los *microarrays* de Affymetrix (*Statistical Algorithms Description Manual*, Affymetrix y *Affymetrix Microarray Suite User's Guide*). Cada sonda del *array* HG-U133A está representada por 22 oligonucleótidos de 25 bases, 11 de ellos son complementarios al ARN mensajero (*Perfect Matches Probes*, PM) y los 11 restantes son idénticos a los PM excepto por una mutación en la base central del oligo (*Mismatch Probes*, MM) (Lockhart *et al.*, 1996). Affymetrix afirma que los oligonucleótidos MM son capaces de detectar las hibridaciones inespecíficas cuando se comparan con el respectivo PM. Por tanto, los niveles de expresión del gen se calculan a partir de la información suministrada por el conjunto de estos veintidós oligonucleótidos.

Cada experimento fue analizado con el procedimiento denominado *Análisis de Expresión Absoluta*, incluido en el programa MAS 5.0. En un primer paso, se corrige la intensidad media

de señal en el *microarray* eliminando la componente debida al ruido de fondo: se calculó el valor medio de fondo en todo el *microarray* y se sustrajo de los valores de intensidad. De forma seguida, se calculó el valor neto de señal normalizada para cada sonda, que mide la abundancia relativa del transcrito, teniendo en cuenta el valor de los pares de oligos PM/MM. El algoritmo calcula también un p -valor asociado a la señal que determina el nivel de significación para la expresión del mensajero en el experimento. En función de la significación asociada a la intensidad, las sondas se califican como “*Presentes*” (P) o “*Ausentes*” (A). El nivel de cambio de expresión entre las dos condiciones experimentales, pacientes y controles, se calculó para cada sonda utilizando el ratio entre la señal media de las muestras con PCOS y de las muestras control.

De forma paralela, en el proceso de sustracción y normalización de la señal se utilizó, como alternativa a los algoritmos del programa MAS 5.0 de Affymetrix, el método RMA (*Robust Multichip Average*), implementado en el programa *RMABExpress*. En este método no se considera el valor de los oligonucleótidos MM en el cálculo de la intensidad de señal.

3.3.5. Análisis estadístico de los datos de microarrays.

Con objeto de determinar genes con diferencias significativas entre los dos grupos, se llevó a cabo el análisis de las diferencias en la expresión génica entre pacientes y controles. Primero, con el fin de asegurar que los valores de expresión se ajustaran a una distribución normal, los valores normalizados de la señal se transformaron a escala logarítmica (\log_2). Esta transformación únicamente fue necesaria en los datos procesados con MAS5.0, pues el algoritmo RMA proporciona datos de señal en escala logarítmica. El análisis estadístico se restringió a las sondas con nivel de expresión detectable en el tejido adiposo (sondas “P”) y, entre ellas, a las sondas con cambios en los niveles de expresión de al menos 1.2 veces en las muestras con PCOS con respecto a los controles.

La significancia estadística de los cambios de expresión génica entre el grupo de pacientes PCOS y controles fue evaluada mediante un test de la T para varianzas desiguales utilizando la herramienta estadística POMELO, implementada en el paquete informático GEPAS (Herrero *et al.*, 2004). Adicionalmente, se empleó la herramienta estadística SAM versión 1.0 (*Significance Analysis of Microarray*) bajo la forma de macro de Excel y utilizando el formato de dos clases no pareadas. Este último método calcula un estadístico d (gen i) que mide la diferencia relativa de expresión entre las dos clases. El valor teórico dE (i) se obtiene tras la permutación n veces de los datos; en nuestro caso se utilizaron 1000 permutaciones. SAM

define que un gen es significativo si la diferencia entre $d(i)$ y $dE(i)$ es mayor que un parámetro Δ , ajustable por el usuario, en función al número de falsos positivos estimado por el método de FDR (*False Discovery Rate*) (Tusher *et al.*, 2001). Por tanto, la ventaja de este método es que realiza una estimación de la tasa de falsos positivos permitiendo la corrección del nivel de significancia estadística frente al empleo de múltiples hipótesis.

Las anotaciones actualizadas de las sondas significativas en el análisis estadístico fueron obtenidas utilizando las herramientas bioinformáticas del Centro de Análisis *NetAffx* de *Affymetrix* (Liu *et al.*, 2003), en conexión con las bases de datos del NCBI y la base de datos *Ensembl* del Instituto Europeo de Bioinformática.

El análisis funcional de los genes desregulados en PCOS fue realizado con las aplicaciones informáticas *NetAffx Gene Ontology Mining Tool* y *Onto-Express* (Draghici *et al.*, 2003), las cuales permiten relacionar los valores de expresión génica con las funciones y procesos biológicos descritos en el Consorcio de *Gene Ontology* (GO) (Ashburner & Lewis, 2002). Se obtuvieron los términos GO con mayor o menor representación significativa entre los genes desregulados en PCOS. Para ello, el número de sondas asociadas a cada categoría GO entre los genes diferencialmente expresados en PCOS fue contrastado en un test de χ^2 con el número que se esperaría encontrar considerando todas las sondas del *array* HG-U133A asociadas a dichas categorías GO, por tanto se valora la probabilidad de la sobrerrepresentación de términos de GO al azar. Los p -valores fueron corregidos mediante el método de Benjamini-Hochberg para controlar el FDR (Benjamini & Hochberg, 1995). Solo aquellos contrastes con p -ajustada ≤ 0.05 fueron considerados como significativos.

Con el fin de agrupar perfiles similares de expresión génica y de estudiar posibles relaciones de coexpresión y correulación entre los genes diferencialmente expresados, se empleó un análisis de agrupamiento jerárquico mediante los programas Génesis y TMEV. Para ello, se empleó el coeficiente de correlación de Pearson como medida de similitud entre los vectores de expresión génica y el método de ligamiento promedio, que selecciona la distancia promedio entre las agrupaciones, para la construcción de los dendogramas.

La herramienta bioinformática TransFAT fue empleada para detectar la representación diferencial de posibles sitios de unión a factores de transcripción (TFBSs) en genes coexpresados en PCOS (Al-Shahrour *et al.*, 2005b). Se buscaron TFBSs para los genes seleccionados en regiones anteriores a la secuencia codificante y distantes hasta 10 kb mediante el programa Match. Cada grupo de genes coexpresados obtenido en el análisis de agrupamiento jerárquico fue comparado contra el resto de genes con expresión alterada en

PCOS (Al-Shahrour *et al.*, 2005b). Se utilizó el test exacto de Fischer con el fin de obtener las sobrerrepresentaciones de TFBSs que presentan significancia estadística (p -valor ≤ 0.05).

Con el fin de resaltar rutas metabólicas, funciones o procesos biológicos que pudieran estar significativamente asociados con el fenotipo PCOS, independientemente del nivel de desregulación de genes individuales, se empleó la herramienta bioinformática FatiScan, donde se combina la información de expresión génica con la información biológica contenida en los términos del Consorcio de GO, así como con la información sobre rutas metabólicas recogidas de la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) del Centro de Bioinformática de la Universidad de Kioto (Japón) (Kanehisa *et al.*, 2004). Primero, el conjunto de sondas “Presentes” en los *microarrays* se ordenaron en base a su expresión diferencial entre las muestras con PCOS y controles utilizando el valor del estadístico t , obtenido mediante el test de la T previamente descrito, como criterio de clasificación. En un segundo paso se evaluaron enriquecimientos significativos de las etiquetas funcionales (términos de GO o rutas metabólicas) en diferentes fraccionamientos de esta lista: partiendo de los valores más altos de t , que se corresponden con las sondas más expresadas en las pacientes con PCOS, se realizaron fraccionamientos del total de sondas en pasos de 0.2 unidades del valor del estadístico. De esta manera se obtuvieron 50 fraccionamientos y, para cada uno de ellos, se evaluó la existencia de enriquecimientos significativos para términos de GO entre las sondas con mayor expresión (test de Fischer, p -valor ajustado < 0.05). Se detectaron distribuciones asimétricas de los genes a lo largo de todo el ordenamiento mediante la representación gráfica de los términos significativos obtenidos para cada partición. Estas representaciones permitieron resaltar grupos de genes con etiquetas funcionales en común, los cuales aparecen significativamente sobrerrepresentados o reprimidos en bloque (Al-Shahrour *et al.*, 2005a).

3.4. VALIDACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR CUANTITATIVA.

Se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa con 1 μ g de ARN total utilizando el kit *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystem) durante 2h a 37 °C. La PCR cuantitativa se realizó con el sistema *ABI Prism 7900HT* (Applied Biosystem) utilizando cebadores y sondas Taqman del sistema de *arrays* de baja densidad de Applied Biosystem (*TaqMan Low Density Array System*). Los ADNc se diluyeron a una concentración final de 0.5 ng/ μ l (volumen final de 100 μ l) con H₂O libre de nucleasas y con la mezcla de reacción 2X

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem). Las condiciones para la reacción de amplificación fueron las siguientes: 50°C durante 2 min., una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min., y 40 ciclos de i) desnaturalización a 95°C durante 15s seguido de ii) alineamiento-elongación a 60°C durante 1 min. El programa ABI 7700 Prism SDS 2.1 (Applied Biosystem) se utilizó para la lectura de la fluorescencia así como en la posterior normalización y análisis de los resultados.

Los genes GAPDH, PPIA y GUSB fueron seleccionados como controles endógenos para estandarizar los niveles de ARN de partida. Para todos los genes estudiados, las reacciones se realizaron por cuádruplicado. Las diferencias en la amplificación génica se cuantificaron de forma relativa mediante el método $2^{\Delta\Delta C_t}$, que calcula los cambios en la abundancia de los ARNm respecto a una referencia (Livak & Schmittgen, 2001), en nuestro caso las muestras controles. El valor de C_t (*Cycle Threshold*) es el número de ciclo en el que la fluorescencia excede al ruido de fondo y el producto amplificado comienza a ser detectado. En este método se determinan las diferencias en los valores C_t entre el gen diana y el control endógeno (ecuación 3.1). Las diferencias en los valores ΔC_t entre las muestras PCOS y controles (ecuación 3.2) fueron utilizadas para cuantificar la amplificación relativa de producto de PCR que se expresó como nivel de cambio mediante la ecuación 3.3.

$$\Delta C_t^{(\text{gen X})} = C_{t_x} - C_{t_{\text{control endógeno}}} \quad (3.1)$$

$$\Delta\Delta C_t^X = \Delta C_t^X_{\text{PCOS}} - \Delta C_t^X_{\text{controles}} \quad (3.2)$$

$$\text{Cambio de expresión} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3.3)$$

La prueba no paramétrica de Mann-Whitney (SPSS 12.0) se utilizó para determinar la significancia estadística ($p\text{-valor} \leq 0.05$) de las diferencias en la abundancia relativa de los genes entre los dos grupos.

3.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA.

3.5.1. Estudio proteómico de la expresión diferencial en el tejido adiposo.

En este trabajo se utilizaron técnicas de proteómica para llevar a cabo un análisis de la expresión diferencial de proteínas en el tejido adiposo omental de pacientes con PCOS. El procedimiento a seguir en cualquier estudio proteómico consiste en tres pasos fundamentales: i) preparación de las muestras, ii) separación de las proteínas e iii)

identificación mediante espectrometría de masas (MS). Como método de separación se eligió la técnica de electroforesis bidimensional que consiste en la separación de las proteínas en función de la carga y del peso utilizando para ello una primera separación mediante isoelectroenfoque (IEF) en gradiente de pH, seguida de una electroforesis en gel de acrilamida con SDS (SDS-PAGE).

3.5.1.1. Protocolo básico de 2DE.

Se extrajeron extractos de proteína total a partir de tejido adiposo omental, disgregando el tejido con un homogeneizador mecánico. Se utilizó un tampón de lisis conteniendo 8.4 M Urea, 2.4 M Tiourea y 5% CHAPS, probándose distintos agentes reductores (DTT o TCEP-HCl). El homogeneizado obtenido se incubó a temperatura ambiente durante 1h bajo agitación suave y posteriormente, se centrifugó en una ultracentrífuga TL-100 (Beckman) a 75,000 rpm durante 90 min a 19 °C, descartándose el precipitado de material insoluble y la fracción lipídica. La fase soluble con las proteínas se conservó a -80 °C en alícuotas hasta su uso. La concentración de proteínas fue cuantificada mediante el método de Lowry siguiendo el protocolo y las soluciones del kit *RC/DC Protein Assay* (Biorad), que lo hacen compatible con altas concentraciones de detergentes y agentes reductores usados en el tampón de lisis.

El isoelectroenfoque de las proteínas se realizó en tiras individuales de poliacrilamida de gradiente de pH inmovilizado (IPG, *Immobiline DryStrips*, GE Healthcare) con el sistema *IPGPhor* (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, con la introducción de pequeñas modificaciones en el programa de IEF con objeto de mejorar el enfoque y resolución de las proteínas del tejido adiposo (Tabla 2.3). Se utilizaron tiras de distintos gradientes de pH (3-10, 4-7 y 6-11) y con distintos tamaños (11 y 18 cm) para aumentar la cantidad de proteína a analizar y, con ello, el número de manchas resueltas en los geles. Se utilizaron dos métodos distintos de aplicación de la muestra: hidratación en gel y *cup-loading*, en función del pH de las tiras IPG utilizadas, ajustando para ello los requerimientos del tampón de carga, recomendados para cada caso (Corton *et al.*, 2004). La tiras se hidrataron en una solución conteniendo 7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS y tampón IPG al 0.5%, con concentraciones variables de agentes reductores o con HED, en función del intervalo de pH utilizado. El programa de IEF utilizado también fue modificado en función del tamaño y pH de las tiras y puesto a punto para cada una de las distintas condiciones.

Con el fin de resolubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro, las tiras IPG se equilibraron tras el IEF durante 15 min en un tampón de equilibrado (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% *v/v* glicerol, 4% *w/v* SDS, con trazas de azul de bromofenol)

suplementado con 10 mg/ml DTT. Seguidamente, se equilibraron otros 15 min en el mismo tipo de tampón con 25 mg/ml de iodoacetamida para prevenir la reoxidación de los grupos tiol durante la electroforesis.

La segunda dimensión se realizó en un sistema de electroforesis vertical, el sistema *MiniProtean* (Biorad) para tiras de 11 cm y el sistema *Protean II XL* (Biorad) para tiras de 18 cm. Se emplearon geles de poliacrilamida al 10-12.5% con SDS usando los protocolos habituales.

Tabla 2.3. Programa básico de isoelectroenfoque.

<i>Paso</i>	<i>Voltaje (V)</i>	<i>Duración (h:min)</i>	<i>Voltios-hora (Vh)</i>
<i>1</i>	30	6	180
<i>2</i>	60	6	360
<i>3</i>	120	1	120
<i>4</i>	200	1	200
<i>5</i>	500	1	500
<i>6</i>	1000	1	1000
<i>7</i>	1000-8000	1:30	7750
<i>8</i>	8000	Variable*	Variable*

* El voltaje total necesario para el enfoque de las proteínas varía en función del tamaño y pH de la tira, alrededor de 15000 y 40000 Vh para tiras de 11 y 18 cm, respectivamente.

Todas las tiras IPG se enfocaron a 0.05 mA/tira IPG.

Los geles se tiñeron con plata siguiendo el protocolo del kit *PlusOne Silver Staining* (GE Healthcare), con ligeras modificaciones para hacer compatible este método de tinción con el análisis por espectrometría de masas. Para ello, se omite el glutaraldehído en la solución de sensibilizado y el formaldehído en la solución de nitrato de plata (Shevchenko *et al.*, 1996). Las imágenes se digitalizaron a una resolución de 300 puntos por pulgada con un densitómetro específico para geles 2-DE (*GS-800 Calibrated Densitometer*, Biorad) y con el programa PD-Quest versión 7.1 (Biorad), utilizado asimismo en el análisis posterior de las imágenes.

3.5.1.3. Protocolo de 2DE-DIGE.

Con el fin de eliminar contaminantes que pudieran interferir en la reacción de marcaje, los extractos proteicos, preparados tal como se recoge en el apartado anterior, fueron precipitados utilizando el kit *2-D Clean Up* (GE Healthcare). El precipitado se resuspende en

un tampón conteniendo 7M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS y 30 mM Tris, ajustando el pH a 8.5.

Esta técnica se caracteriza por el empleo de un estándar interno constituido por la mezcla equimolecular de todas las muestras a analizar. Este patrón interno se carga en cada uno de los geles del experimento junto con muestras de los dos tipos fenotípicos a comparar. Para ello, las muestras se marcaron de forma diferencial con tres tipos de fluorocromos, *Cy3*, *Cy5* ó *Cy2* (*CyDye™ DIGE Dyes*, GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante, en condiciones de marcaje mínimo: 400 pmol de fluorocromo para cada 50 µg de proteína. Estos fluorocromos presentan un grupo éster NHS reactivo diseñado para producir una unión covalente al grupo amino γ de los residuos de lisina. En estas condiciones de marcaje se marcan únicamente el 3% las de proteínas presentes y sólo en una única lisina por molécula de proteína (Alban *et al.*, 2003). Tras 30 min de incubación en hielo y en oscuridad, se paró la reacción de marcaje con lisina 10 mM.

El IEF se realizó en tiras IPG de 24 cm de longitud y rango de pH 4-7. Después de hidratar las tiras en 450 µl del tampón de hidratación (7M Urea, 2M Tiourea, 2% CHAPS, 40 mM Tris-Cl) con 1.2% de HED y 0.7% de tampón IPG pH 3-10 (*Pharmalytes*, GE Healthcare), la muestra se cargó mediante el procedimiento de *cup-loading*. En cada gel se cargaron en total 150 µg de proteína en un volumen final de 100 µl de solución de hidratación suplementado con 2 mg/ml DTT y 0.7 % (*v/v*) de tampón IPG pH 3-10. Seguidamente, la muestra se enfocó siguiendo el programa de isoelectroenfoco reflejado en la tabla 2.4.

La separación en geles SDS-PAGE se realizó en el sistema de electroforesis *Ettan DALT Six* (GE Healthcare). Los geles se polimerizaron al 12.5% de acrilamida en cristales de baja fluorescencia. La separación electroforética se realizó en una etapa de 30 minutos a 2.5 W/gel seguida de otra etapa de 5 horas a 20 W por gel hasta un máximo de 100 W.

Tabla 2.4. Programa de isoelectroenfoco utilizado para DIGE.

<i>Paso</i>	<i>Voltaje (V)</i>	<i>Duración (h)*</i>
<i>1</i>	300	4
<i>2</i>	300-1000	4
<i>3</i>	1000-8000	2
<i>4</i>	8000	3

* El voltaje total necesario para el enfoque de las proteínas es de 42000 Vh.

Todas las tiras IPG se enfocaron a 0.05 mA/tira.

Una vez acabada la electroforesis, se obtuvieron las imágenes de fluorescencia para los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 a longitudes de excitación/emisión de 488/520, 532/580 y 633/670, respectivamente mediante el escáner *Typhoon 9400* (GE Healthcare). Finalmente, las proteínas se visualizaron con un método de tinción visible siguiendo el protocolo de tinción de plata anteriormente descrito.

El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el paquete informático *DeCyder 5.01* (GE Healthcare). Primero, se utilizó el módulo DIA (*DeCyder Differential In-Gel Analysis*) para normalizar y codetectar las señales Cy2/Cy3/Cy5 de cada mancha resuelta en el gel. Asimismo, se realizaron las comparaciones entre las muestras PCOS *vs* Control para cada gel, calculándose los volúmenes normalizados por el patrón interno (Cy3: Cy2 ó Cy5: Cy2). Con el módulo BVA (*DeCyder Biological Variation Analysis*), se emparejaron las manchas detectadas en todos los geles y se calcularon los cambios en la abundancia relativa en las muestras PCOS con respecto a los controles, medida por la ecuación 3.4. Para valorar si los cambios detectados presentaban significancia estadística, se aplicó un test de la T no pareado entre los dos grupos ($p\text{-valor} \leq 0.05$).

$$\text{Abundancia relativa} = \text{Vol normalizado PCOS} / \text{Vol normalizado Controles} \quad (3.4)$$

El marcaje fluorescente de las muestras y la preparación de los geles correspondientes se realizaron en colaboración con la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas (Instituto de Salud Carlos III, Madrid).

3.5.2. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.

La identificación de proteínas separadas en geles de poliacrilamida constó de varios pasos, incluyendo la digestión *in situ* de las proteínas, la extracción de los péptidos resultantes y la determinación de las masas peptídicas mediante MALDI-TOF. Por último, se empleó una estrategia de identificación mediante huella peptídica, en la que los espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF permiten la identificación de las proteínas en estudio utilizando programas de búsqueda que comparan la información experimental con la existente en las bases de datos.

Las manchas de proteína fueron recortadas manualmente y digeridas con tripsina de forma automática en un robot digestor *Proteineer DP* (Bruker-Daltonics). Se empleó el

protocolo de digestión de Shevchenko (*Shevchenko et al., 1996*), con ligeras variaciones: las proteínas se redujeron con 50 μ l de 10 mM DTT en tampón bicarbonato amónico (50 mM NH_4HCO_3 al 99,5%) durante 1 h a 25 °C. Posteriormente, las cisteínas reducidas se carbamidometilaron añadiendo el mismo volumen de iodoacetamida (55 mM) en tampón NH_4HCO_3 e incubando durante 30 minutos a 25 °C en oscuridad. Los fragmentos de gel fueron lavados con tampón NH_4HCO_3 , deshidratados con acetonitrilo y secados en corriente de nitrógeno. A continuación, se añadió tripsina porcina modificada a una concentración de 13 ng/ μ l en tampón NH_4HCO_3 y se dejó transcurrir la digestión durante 6 h. Por último, los péptidos se recuperaron de los restos del gel mediante su extracción con ácido trifluoroacético al 0.5%. Una fracción del digerido peptídico se mezcló con una alícuota de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics) en acetonitrilo acuoso al 33% y 0.1% de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en un portamuestras *MALDI AnchorChip* de 600 μ m (Bruker-Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente.

Durante la optimización del protocolo para la obtención de los mapas 2DE del tejido adiposo omental, los espectros de masas fueron obtenidos con un espectrómetro de masas MALDI-TOF *Reflex IV* (Bruker-Daltonics) en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología. En el estudio de la expresión diferencial de proteínas en el tejido adiposo de pacientes PCOS, las identificaciones se realizaron con un espectrómetro de masas MALDI *Ultraflex* (Bruker-Daltonics) en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas.

La búsqueda de las masas peptídicas se llevó a cabo con el programa informático MASCOT (Matrix Science) utilizando la base de datos NCBI nr. El programa proporciona una lista priorizada que incluye aquellas proteínas que presentan mayor probabilidad de corresponderse con la proteína analizada en función de su huella peptídica.

3.5.3. Western Blot.

Se extrajo proteína total a partir de tejido adiposo omental por homogeneización mecánica con el tampón de lisis RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (*v/v*) NP-40, 0.1% (*w/v*) SDS, 0.5 % (*w/v*) deoxicolato sódico) suplementado con inhibidores de proteasas (100 μ g/ml PSMF, 2 μ g/ml aprotinina y 2 μ g/ml leupeptina). El homogeneizado obtenido se incubó durante 1h y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 90 min a 4°C para eliminar el material soluble y los lípidos. La cuantificación de proteínas se realizó

por el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el protocolo y los reactivos del kit *BCA Protein Assay* (Pierce).

15-30 µg de proteínas se resuspendieron en el tampón de carga Laemmli (2% (*w/v*) SDS, Tris-HCl 1 M pH 6.8, Glicerol, 0.1% (*w/v*) azul de bromofenol, β-mercaptoetanol) y se desnaturalizaron a 100 °C durante 5min. Se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% utilizando el sistema *Mini-Protean* (BioRad). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (*Immobilon-P*, Millipore) con el sistema *Mini-Protean TransBlot Cell* (BioRad) mediante protocolos estándares. Posteriormente, las membranas fueron teñidas con Rojo *Ponceau* con el fin de verificar la correcta transferencia y carga de las proteínas.

En la tabla 2.5, se detallan los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo para la inmunodetección de las proteínas, así como las diluciones y condiciones específicas de bloqueo y detección con anticuerpos secundarios IgG-HRP. Las membranas fueron reveladas utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, GE Healthcare).

Las imágenes se digitalizaron con un densitómetro calibrado *GS-800* (Biorad) y se analizaron mediante el programa *Quantity One* (Biorad). En los casos en los que se observaron diferencias de expresión entre las pacientes PCOS y controles, se aplicó un test de la T (SPSS 12.0) con el fin de determinar si las diferencias encontradas presentaban significancia estadística ($p\text{-valor} \leq 0.05$).

Tabla 2.5. Anticuerpos y condiciones utilizados para la inmunodetección de proteínas.

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Bloqueo</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>
<i>anti-NQO1</i> ^a	1:200	5% leche en TBS, 0.2 % (<i>v/v</i>) Tween 20	<i>anti-ratón</i> (1:1000)
<i>anti-GSTM3</i> ^b	1:2000	1% BSA en PBS, 0.1 % (<i>v/v</i>) Tween 20	<i>anti</i> -conejo (1:4000)
<i>anti-HSD11B1</i> ^c	1:1000	20% leche en PBS, 0.1 % (<i>v/v</i>) Tween 20	<i>anti</i> -oveja (1:20000)
<i>anti-NPR-C</i> ^d	10 µg/ml	5% leche en PBS, 0.1 % (<i>v/v</i>) Tween 20	<i>anti</i> -conejo (1:4000)

Los anticuerpos fueron amablemente donados por los siguientes investigadores: ^a Dr. David Siegel; ^b Dr. John Hayes; ^c Dra. Iwona Bujalska; ^d Dr. George Trachte

3.6. DIRECCIONES WEB UTILIZADAS.

3.6.1. Bases de datos.

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ensembl: <http://www.ensembl.org/>

ExPASy (*Expert Protein Analysis System*): <http://www.expasy.org/>

WORLD-2DPAGE: <http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>

Consorcio de GO: <http://www.geneontology.org/>

KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*): <http://www.genome.jp/kegg/>

TRED (*Transcriptional Regulatory Element Database*): <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/>

3.6.2. Programas bioinformáticos

Análisis genómico

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

- Ensembl: <http://www.ensembl.org/Multi/blastview>

Map Viewer: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi

Primer3: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 WWW.cgi>

Procesamiento y Análisis de microarrays

RMA Express:

<http://www.stat.berkeley.edu/users/bolstad/RMAExpress/RMAExpress.html>

GEPAS (*Gene Expression Pattern Analysis Suite*): <http://gepas.bioinfo.cipf.es/>

<http://asterias.bioinfo.cnio.es/>

POMELO: <http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>

SAM: <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>

Genesis: <http://genome.tugraz.at/Software/GenesisCenter.html>

TMEV (*TIGR MultiExperiment Viewer*): <http://www.tm4.org/>

NetAffyx: <https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>

Onto-Express: <http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>

TransFAT: <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/fatigoplus/cgi-bin/fatigoplus.cgi>

FatiScan: <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/fatiscan/cgi-bin/fatiscan.cgi>

Mapeo peptídico

MASCOT: <http://www.matrixscience.com/>

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ASOCIACIÓN DEL PCOS CON VARIANTES ALÉLICAS RELACIONADAS CON EL SÍNDROME METABÓLICO.

Distintos trabajos han sugerido un modelo complejo de herencia para el PCOS siendo el resultado de la interacción de múltiples genes de susceptibilidad, y de éstos con factores ambientales, como la obesidad, el estilo de vida sedentario, factores poblacionales, etc. (Escobar-Morreale *et al.*, 2005b; Franks *et al.*, 2006). Asimismo, existen indicios para la implicación de un proceso de selección natural positiva en la etiología del PCOS pues algunos de los rasgos fenotípicos característicos del PCOS, como el hiperandrogenismo, podrían haber favorecido la supervivencia durante el proceso evolutivo (Witchel *et al.*, 1997). Esta misma hipótesis evolutiva ha sido aplicada para explicar la alta prevalencia de la obesidad y del síndrome metabólico, así como su asociación a variantes alélicas comunes (Fernandez-Real & Ricart, 1999). Si consideramos la frecuente asociación del PCOS a patologías relacionadas con el síndrome metabólico, no sería extraño que distintos polimorfismos de genes candidatos para resistencia a insulina y obesidad pudieran estar implicados en el modo de herencia del PCOS. Con objeto de estudiar esta asociación, se llevó a cabo un estudio caso-control para evaluar el posible papel, en la patología del PCOS, de varios marcadores polimórficos localizados en genes candidatos, previamente relacionados con la patogénesis de la resistencia a insulina, DMT2 u obesidad.

Durante este trabajo de Tesis Doctoral, se analizaron 6 variantes alélicas en 4 genes candidatos mediante genotipación con la técnica PCR-RFLP (Tabla 3.1, Materiales y Métodos). Se empleó una población formada por 114 individuos, incluyendo 72 mujeres diagnosticadas con PCOS (media \pm SD): edad 24.6 ± 6.9 años, rango 14-42 años; IMC 29.9 ± 8.6 kg/m², rango 16.3–57.5 kg/m², y 42 mujeres sanas no hiperandrogénicas (edad 31.1 ± 8.0 años, rango 16–47 años; IMC 28.1 ± 7.8 kg/m², rango 16.2 – 44.9 kg/m²). Tal como refleja la comparación de las características clínicas, hormonales y bioquímicas entre ambos grupos de individuos (Tabla 4.1), las pacientes con PCOS presentan un aumento significativo del hirsutismo en comparación con los controles no hiperandrogénicos, así como de los niveles de androstenediona y testosterona, acompañado de una disminución de la concentración de SHBG ($p < 0.05$). Los niveles de insulina y el índice de resistencia a insulina están asimismo aumentados en las pacientes con PCOS en comparación con los controles, mientras que no se observan diferencias en los niveles de glucosa. Los niveles de DHEAS muestran una tendencia a estar incrementados en las mujeres con PCOS, rozando el nivel de significancia estadística ($p = 0.058$).

TABLA 4.1. Variables clínicas y bioquímicas en pacientes PCOS y mujeres control

	PCOS (n=72)	Controles (n=42)	<i>p</i> -valor
Índice de hirsutismo	13.2 ± 6.6	1.6 ± 1.4	<0.001
Testosterona total (ng/dl)	70 ± 31	42 ± 10	<0.001
Testosterona libre (ng/dl)	1.3 ± 0.9	0.6 ± 0.3	<0.001
SHBG (µg/dl)	314 ± 174	545 ± 242	<0.001
DHEAS (ng/ml)	2686 ± 1408	1833 ± 897	0.058
Androstenediona basal (ng/ml)	3.9 ± 1.4	2.6 ± 0.9	<0.001
Glucosa en ayunas (mg/dl)	86 ± 9	87 ± 10	0.385
Insulina en ayunas (µU/ml)	16 ± 10	11 ± 7	<0.010
Índice de resistencia a insulina en ayunas (mmol/mU ·litro ²)	3.2 ± 2.2	2.2 ± 1.4	<0.010

Los datos representan media ± SD. Se compararon los valores medios mediante un análisis de covarianza corrigiendo la diferencia de edad existente entre pacientes y controles. Los datos se transformaron logarítmicamente con el fin de ajustarlos a una distribución normal.

La distribución de los diferentes genotipos para las variantes polimórficas estudiadas se muestra en la tabla 4.2. En principio, ninguno de los polimorfismos muestra una distribución diferencial de los pacientes con PCOS en comparación con los controles. Adicionalmente, se evaluó la posible influencia de las variantes alélicas estudiadas sobre las distintas variables clínicas y bioquímicas relacionadas con hiperandrogenismo y resistencia a insulina, sin que se obtuviese ninguna observación significativa.

Las frecuencias del polimorfismo -675 4G/5G en el gen PAI-1 entre los pacientes con PCOS y los controles presentan diferencias que están próximas a la significancia estadística. No se puede descartar esta asociación de forma definitiva, pues el pequeño tamaño muestral puede estar limitando el poder estadístico del estudio. Por otro lado, se observa una mayor frecuencia de homocigotos 4G/4G y heterocigotos entre los pacientes PCOS lo que indica que existen diferencias en la distribución del alelo 4G entre los dos grupos de individuos. El 24% de las pacientes PCOS presentan homocigosidad para el alelo 5G frente al 41% de los controles ($p = 0.089$), de modo que más que un posible efecto del alelo 4G en la patología del PCOS, se podría pensar que el alelo 5G presenta un papel protector frente al PCOS. Esta hipótesis ha sido confirmada de forma posterior a nuestro trabajo en el estudio del polimorfismo en una población de mujeres griegas con PCOS (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2004). PAI-1 codifica para una glicoproteína de la familia de los inhibidores de serín-proteasas que participa en el proceso de inhibición del sistema fibrinolítico y ha sido

implicada en la degradación de la pared del folículo y en el control de la proteólisis extracelular durante la fase luteínica (Smith *et al.*, 1997), por lo que se ha especulado que PAI-1 podría estar relacionado con la anovulación en el PCOS (Atiomo *et al.*, 1998). Sin embargo, otros trabajos no encuentran asociación entre el SNP 4G/4G (Walch *et al.*, 2005) o los niveles séricos de PAI-1 con la patología del PCOS (Atiomo *et al.*, 2000). Los resultados aquí presentados no aclaran las discrepancias existentes, pero sí muestran evidencias para la posible asociación del polimorfismo -675 4G/5G de PAI-1 con el PCOS.

Tabla 4.2. Comparativa de las frecuencias genotípicas de las variantes alélicas en pacientes PCOS y mujeres control.

Gen	Genotipo	Controles(n = 42)	PCOS (n = 72)	χ^2	<i>p-valor</i>
PAI-1	-675 4G/4G	0.190	0.254	3.442	0.179
	-675 4G/5G	0.405	0.507		
	-675 5G/5G	0.405	0.239		
Adiponectina	T45T	0.690	0.667	0.114	0.945
	T45G	0.286	0.300		
	G45G	0.024	0.033		
Adiponectina	G276G	0.429	0.387	0.610	0.737
	G276T	0.476	0.468		
	T276T	0.095	0.145		
PTP1B	WT/WT	0.929	0.898	0.277	0.732
	WT/Ins1484G	0.071	0.102		
PTP1B	C981C	0.833	0.881	0.474	0.565
	C981T	0.167	0.119		
PON1	Gln192Gln	0.571	0.580	0.946	0.623
	Gln192Arg	0.286	0.333		
	Arg192Arg	0.143	0.087		

No hemos encontrado asociación entre los polimorfismos T45G y G276T en el gen de la adiponectina con PCOS o con los índices de resistencia a insulina. Tras la publicación del estudio aquí presentado, otros autores han obtenido resultados discrepantes. Así, se ha descrito en dos trabajos que la frecuencia del alelo 45G y del alelo 276T es significativamente mayor en mujeres PCOS con respecto a controles en población alemana y finlandesa, respectivamente (Haap *et al.*, 2005; Heinonen *et al.*, 2005). En concordancia con nuestros resultados, en un reciente estudio realizado en una población de mujeres griegas, no se ha

observado ningún tipo de asociación a PCOS, sin embargo sí se describe la influencia de estos alelos sobre variables clínicas relacionadas con el síndrome metabólico (Xita *et al.*, 2005). Estas discrepancias en la asociación de variantes alélicas en el gen de la adiponectina con el PCOS se pueden deber a la existencia de diferencias poblacionales en la contribución relativa de un polimorfismo y a la posible influencia de factores ambientales. Curiosamente, se ha publicado la asociación de polimorfismos de la adiponectina con el PCOS en poblaciones del norte de Europa, y muestra un resultado opuesto a los estudios realizados en poblaciones mediterráneas; este hecho nos podría estar indicando que la dieta y el estilo de vida, asociados al fondo genético de una población, modularían la acción de las variantes genómicas sobre el desarrollo del PCOS.

Ninguno de los polimorfismos en el gen PTP-1B, tirosín-fosfatasa implicada en la regulación de la sensibilidad a la insulina, se asocia con PCOS en nuestro estudio. Tampoco hemos observado asociación con parámetros de insulinoresistencia, a diferencia de otros trabajos en donde se describe la asociación significativa entre el alelo 1484ins con aumentos en el índice HOMA (Di Paola *et al.*, 2002) o la reducción del riesgo a DM2 en indios Oji-Cree portadores del alelo 981T (Mok *et al.*, 2002).

En el estudio aquí presentado, no se observa asociación entre la variante Gln192Arg al gen PON1 y el PCOS. Nuestro grupo ha estudiado la asociación de otras dos variantes alélicas en el gen PON1 con el PCOS: la sustitución T108C en la región promotora del gen y la sustitución no conservativa Leu55Met (San Millan *et al.*, 2004). De los tres polimorfismos de PON1 estudiados hasta el momento, únicamente se ha detectado la asociación del PCOS al polimorfismo T108C (*p-valor* = 0.004). Asimismo, se ha encontrado una influencia de las variantes T108C y Leu55Met en los marcadores de hiperandrogenismo, obesidad y resistencia a insulina utilizados. Individuos homocigotos para el alelo -108T presentan un aumento significativo en el grado de hirsutismo y el nivel de andrógenos en sangre, lo que indica una posible asociación con hiperandrogenismo; por otro lado, los portadores del alelo 55M en homocigosis presentan mayores índices de masa corporal y de resistencia a insulina y aumento en las concentraciones de glucosa e insulina en sangre (San Millan *et al.*, 2004). El gen PON1, que codifica para la paroxonasa sérica, una enzima antioxidante asociada a partículas HDL, presenta una regulación negativa por andrógenos y mediadores proinflamatorios (bin Ali *et al.*, 2003). Se ha descrito que la presencia del alelo -108T en homocigosis reduce la expresión *in vitro* del gen PON1, demostrándose la influencia del polimorfismo -108 C→T en la transcripción del gen (Brophy *et al.*, 2001). Por tanto, la combinación de hiperandrogenismo y homocigidad para el alelo -108TT en pacientes

PCOS podría conducir a la reducción de la expresión de PON1 y, con ello, contribuir en el aumento del estrés oxidativo observado en el PCOS.

A excepción de la variante 4G/5G en el gen PAI-1, no parece que los polimorfismos estudiados en este trabajo presenten un papel importante en la patogénesis del PCOS en nuestra población de estudio. Esto no significa que se descarten estos genes como candidatos a genes de susceptibilidad para PCOS o patologías asociadas al síndrome metabólico pues otros polimorfismos en estos genes, tal como ha ocurrido con el gen PON1, podrían estar implicados en la modulación de la susceptibilidad a PCOS. Asimismo, si se considera el gran número de variantes alélicas que han sido asociadas a PCOS, muchas de estas asociaciones no han podido ser replicadas en poblaciones diferentes (Escobar-Morreale *et al.*, 2005b), como reflejo de la influencia de los factores ambientales en la etiología de la enfermedad. Por ello, sería conveniente utilizar poblaciones de mayor tamaño muestral, en las cuales los posibles factores ambientales estuviesen claramente definidos. Por último, no hay que olvidar que las discrepancias en los estudios de asociación también pueden deberse a la utilización de diferencias en los criterios de diagnóstico del PCOS, así como en los protocolos de selección de casos y controles.

4.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN PCOS MEDIANTE MICROARRAYS DE ADN.

La aplicación de las estrategias genéticas anteriormente descritas no ha dado lugar a la identificación de genes candidatos para el PCOS que hayan podido ser validados en distintos tipos de poblaciones. Dado que los defectos primarios responsables de una determinada patología se reflejan a nivel de alteraciones en la expresión génica, las recientes técnicas de genómica comparativa representan una clara alternativa a los estudios genéticos clásicos, pues no se seleccionan *a priori* los genes a estudiar, sino que se busca identificar, entre la totalidad del genoma, aquellos genes que se encuentran expresados de forma desigual entre las dos condiciones a estudiar. El desarrollo en la última década de técnicas de alto rendimiento para el análisis de expresión génica ha facilitado enormemente este tipo de estudios comparativos. Entre estas técnicas, los *microarrays* de ADN han obtenido un mayor desarrollo y aplicabilidad en los estudios de expresión génica que otros tipos de estrategias, como el SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) o el RDA (*Representational Difference Analysis*), pues permiten estudiar miles de genes de forma simultánea proporcionando una visión global bastante completa sobre el sistema en estudio.

4.2.1. Descripción de sujetos de estudio.

Con el fin de evitar falsas asociaciones por la influencia de la obesidad en las funciones del tejido adiposo, como ocurre al comparar poblaciones de obesos y delgados, los sujetos de estudio han sido cotejados por obesidad. Además, dado el amplio intervalo en la definición de sobrepeso y obesidad ($IMC > 25$ y > 30 , respectivamente), que puede conducir a que se engloben como obesos dentro de una misma población a individuos con características metabólicas muy variadas, en este estudio se empleó una población homogénea de unos 40 individuos con obesidad mórbida ($IMC > 40$). Las muestras de tejido adiposo omental fueron obtenidas durante el transcurso de una intervención de cirugía bariátrica. En este sentido, esta estrategia evita problemas asociados al empleo de poblaciones poco homogéneas con respecto a las características metabólicas de los sujetos de estudio, de modo que las diferencias metabólicas observadas entre el grupo de pacientes con PCOS y controles podrán ser atribuidas al PCOS y no a la influencia de la obesidad.

Se seleccionó un grupo de 15 individuos en base a su homogeneidad en las características clínicas y bioquímicas analizadas, a excepción de aquellas que definen el diagnóstico de PCOS, y se excluyeron para este estudio mujeres post-menopáusicas o con DM2 y, en el caso de los individuos control, todas las que presentaran el mínimo rasgo hiperandrogénico o alteraciones menstruales. El grupo de estudio está formado por 8 pacientes diagnosticadas con PCOS (edad 31.6 ± 7.9 años; $IMC 51.0 \pm 10.2$ kg/m², rango, 41 - 75 kg/m²) y 7 mujeres controles no hiperandrogénicas (edad 40.4 ± 3.6 años; $IMC 52.8 \pm 5$ kg/m², rango 44 - 58). Las diferencias en las variables clínicas y hormonales entre los pacientes PCOS y mujeres control se evaluaron por el test U de Mann-Whitney.

Tal como se muestra en la Tabla 4.3, se observaron diferencias estadísticamente significativas en parámetros hiperandrogénicos. En comparación con los controles, las pacientes con PCOS presentaban mayor grado de hirsutismo, una concentración mayor de testosterona libre y menor de SHBG. Estas pacientes muestran también un aumento en el nivel de androstenediona y una disminución en los niveles de HDL-c y en el ratio glucosa-insulina que rozaron los niveles de significancia estadística ($p\text{-valor} < 0.1$). De acuerdo con estudios previos, donde se describe que las mujeres con PCOS presentan un mayor grado de hiperinsulinemia y resistencia a insulina que las mujeres control a igualdad de IMC y edad (Burghen *et al.*, 1980; Dunaif *et al.*, 1987), las pacientes con PCOS incluidas en este trabajo, a pesar de ser ligeramente más jóvenes, presentan un aumento en los niveles de

insulinorresistencia, medido por el índice HOMA-IR, y de insulina en ayunas, cercano a dos veces cuando se comparan con los controles no hiperandrogénicos.

Tabla 4.3. Características clínicas y bioquímicas de los individuos del estudio con *microarrays*

	Controles (n = 8)		Pacientes PCOS (n = 7)		p-valor*
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
Ratio cintura - cadera	0.84	0.10	0.77	0.09	0.281
Índice de hirsutismo	2	3	9	12	0.004
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	130	20	130	0	0.902
Presión sanguínea diastólica (mm Hg)	70	20	80	15	0.456
Presión sanguínea media (mm Hg)	93	20	97	10	0.805
Colesterol total (mg/dL)	180	43	178	74	0.779
Colesterol - HDL (mg/dL)	49	16	37	10	0.072
Colesterol - LDL (mg/dL)	110	32	113	41	0.536
Triglicéridos (mg/dL)	104	52	123	66	0.463
Testosterona total (ng/dL)	45.7	31.4	75.9	53.5	0.336
SHBG (μg/dL)	325	124	161	146	0.009
Testosterona libre (ng/dL)	0.97	0.52	1.56	1.06	0.040
LH (mUI/mL)	8.4	28.9	6.3	5.5	0.648
FSH (mUI/mL)	14.9	19.7	5.1	1.4	0.073
DHEAS (ng/mL)	982	1159	1330	1630	0.128
17-OH-Progesterona (ng/mL)	0.8	1.0	0.8	0.5	0.535
Δ ⁴ -Androstenediona (ng/mL)	2.0	0.7	4.0	3.7	0.053
Glucosa en ayunas (mg/dL)	90	17	95	4	0.281
Insulina en ayunas (μUI/mL)	11.8	17.8	23.8	25.6	0.121
Ratio glucosa/insulina	0.06	0.03	0.03	0.03	0.094
HOMA-IR	2.8	8.0	5.4	6.6	0.232

Datos expresados en medianas y rango intercuartil (IQR). *Calculado por el test U de Mann-Whitney.

4.2.2. Control de calidad de los microarrays.

Con el fin de controlar la variabilidad asociada a los aspectos técnicos del método de hibridación, en este trabajo se han utilizado *microarrays* y protocolos estandarizados de la empresa Affymetrix. Esta elección no solo se debió a la disposición de un *array* comercial con el mayor número de sondas para genes conocidos, el HG-U133A, (21,722 sondas para 15,713 genes y 1474 ESTs) en el momento de realizar este estudio, sino además por la gran experiencia existente con esta tecnología, tal como avalaba la numerosa bibliografía publicada.

Como la calidad del ARN empleado es crucial para la reproducibilidad y el éxito de cualquier estudio de expresión génica, hemos empleado únicamente ARN cuya integridad hubiera sido contrastada por dos métodos, tal como se describe en el Apartado 3.3.1. Hemos verificado asimismo la calidad del ARNc mediante su hibridación en el *array Genechip Test 3*, que contiene un número pequeño de sondas de genes humanos, de ratón, de rata y de levadura, de forma previa a la hibridación en los *microarrays* HG-U133A.

Antes de proceder al análisis de los datos de expresión génica y con el fin de comprobar si todos los *arrays* hibridados eran comparables entre sí, se verificó la calidad del proceso de hibridación. Primero, se inspeccionó la imagen del *array* para detectar posibles artefactos debidos a una incorrecta hibridación. Después, se comprobó que el nivel de ruido de fondo fuese homogéneo entre los experimentos y que estuviera comprendido en un valor de intensidad entre 20 y 100. Se comprobó que los controles positivos de hibridación, así como los controles de sensibilidad, todos ellos introducidos en la mezcla de hibridación junto con el ARNc, estuvieran presentes en los *arrays*, lo cual nos indicó que los distintos procesos de hibridación, lavado y revelado habían transcurrido de forma correcta. Otra evidencia más que confirmaba la integridad del ARNc utilizado fue que el ratio de las señales entre la sonda 3' y la sonda 5' del gen GAPDH, utilizado como control interno, presentó un valor medio cercano a 1 en todos los *arrays*. Otros parámetros importantes que se tuvieron en cuenta en este control de calidad fueron el porcentaje de sondas presentes (P) y el factor de escalado (SF), obteniéndose unos valores medios del 48% y de 0.38, respectivamente, con mínimas variaciones entre las muestras. Diferencias considerables en estos parámetros indicarían una alta variabilidad entre las muestras o la degradación de alguna de ellas. En la tabla 4.4, se muestran los parámetros que verifican que los *arrays* pueden ser comparados ya que cumplen todos estos criterios.

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica, se hibridaron como réplicas técnicas dos *arrays* adicionales a las quince muestras: i) uno con ARN de un mismo individuo procedente de una extracción independiente y, ii) otro con ARN procedente de la misma extracción en una hibridación independiente. Se obtuvo una alta reproducibilidad experimental ($r^2 = 0.98$ para la primera réplica y $r^2 = 0.97$ en la segunda) cuando se comparó la consistencia entre los replicados mediante los gráficos de dispersión, tal como se muestra en la Figura 4.1. Cuando se comparó la dispersión de muestras diferentes, se observó poca variabilidad entre ellas ($0.97 > r^2 > 0.84$), lo que nos indicó que el número de genes con expresión diferencial no parecía que fuese a ser muy elevado.

Tabla 4.4. Parámetros utilizados para valorar la calidad de la hibridación en los *microarrays*.

Muestra	SF*	Fondo	% “Presentes” †	3'/5' GAPDH ‡
P1A	0.45	80.22	51.7	1.03
P1B	0.36	81.37	52.3	0.81
P2	0.33	75.7	46	0.96
P3	0.44	77.49	45.4	0.88
P4	0.38	81.99	45.7	1.24
P5	0.43	81.42	48.8	0.77
P6	0.35	75.04	48.9	0.97
P7	0.32	78	46.8	0.94
P8	0.33	74.33	48.6	1.06
C1	0.33	80.17	45.3	0.93
C2	0.33	78.08	52.8	0.85
C3	0.53	88.03	48.2	0.69
C4A	0.36	119.54	44.82	0.83
C4B	0.4	95.46	48.7	0.76
C5	0.34	98.15	50.8	0.79
C6	0.32	85.06	45.6	0.97
C7	0.46	76.75	45.6	1.13
Media±SD	0.38±0.06	83.93±11.3	48.00±2.64	0.92±0.14

* Las diferencias en los valores del factor de escalado (SF) no deben ser superiores a 3 veces.

† En los *arrays* tipo A de Affymetrix, donde la mayoría de las sondas están diseñadas frente a transcritos bien caracterizados, el porcentaje de genes “Presentes” debería ser mayor de un 25%. El porcentaje de P tiene que ser consistente entre las distintas muestras para poder ser comparadas, con diferencias menores al 10 %.

‡. Un valor superior a 3 puede indicar que el ARN estaba degradado o que la transcripción no se ha producido correctamente. Cuánto más próximo a 1 sea este valor, mayor integridad existe en el ARNc.

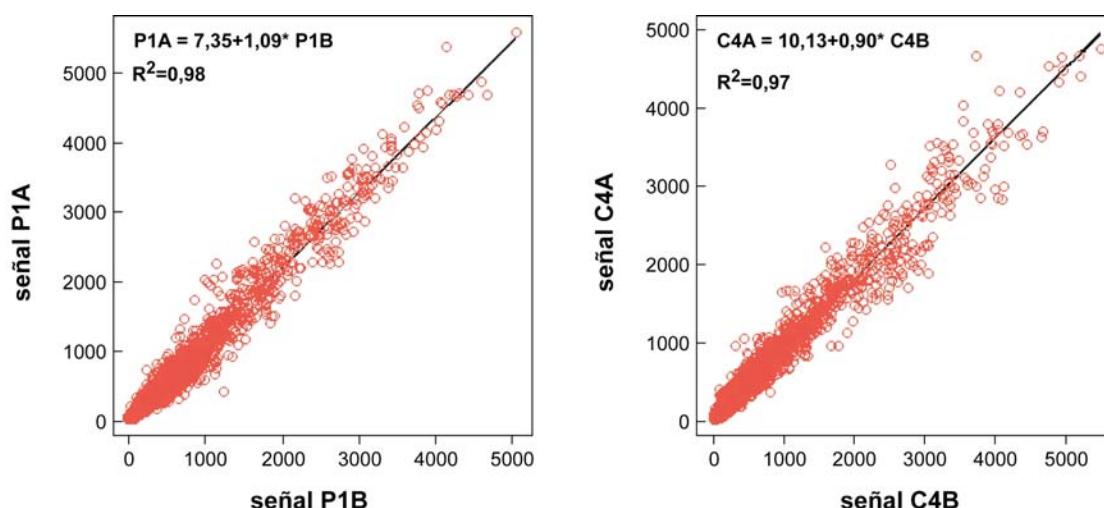


Figura 4.1. Visualización de la distribución de los datos normalizados de *microarrays*. Se realiza la comparación de los dos tipos de réplicas mediante un gráfico de dispersión de los valores de señal.

4.2.3. Análisis de la expresión génica diferencial.

Con el fin de buscar genes con expresión alterada en las muestras de mujeres PCOS, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial. Para ello, se redujo primero la complejidad de la matriz de datos eliminando sondas que no son informativas, es decir, aquellas que no se expresan en el tejido adiposo omental (“Ausentes”) y aquellas que no muestran cambios de expresión entre los dos grupos ($\text{ratio} < |1.2|$). De las 22,284 sondas representadas en el *Genechip* HG-U133A, 3,055 pasan estos dos criterios de filtrado. Finalmente, se aplicó un test estadístico que actuó como un tercer filtro con el fin de descartar diferencias de expresión que no fueran consistentes entre todas las muestras y de resaltar sondas con cambios de expresión estadísticamente significativos.

Dado que ha sido descrito que una señal fuerte de los oligonucleótidos MM pueden enmascarar la señal de los oligonucleótidos PM y, en consecuencia, influir en el cálculo del valor neto de la señal (Irizarry *et al.*, 2003), hemos considerado oportuno utilizar en el proceso de sustracción y normalización de la señal un método alternativo a los algoritmos desarrollados por Affymetrix (MAS5.0). Con este fin se utilizó el algoritmo RMA, el cual emplea únicamente la información de los oligos PM sin considerar las señales de sus respectivos oligos MM (Irizarry *et al.*, 2003; Kothapalli *et al.*, 2002). Hemos encontrado que existe una gran correlación entre los dos métodos de normalización cuando se emplean datos filtrados, de manera similar a lo descrito en otros trabajos (Barash *et al.*, 2004; Jarvinen *et al.*, 2004). Las discrepancias observadas entre ambos métodos recalcan en sondas con nivel de expresión bajo o con mayor número de “A” en MAS 5.0. Aunque la normalización por RMA aumenta la sensibilidad, el nivel de cambio observado es menor en general para todas las

sondas. Dado que un aumento en la sensibilidad puede introducir mayor ruido en los resultados, las sondas que presentan diferencias de la expresión solamente con el método RMA y no con la normalización por MAS 5.0, tienen una interpretación más problemática y no han sido incluidas en el estudio posterior.

No existe un método estadístico que pueda ser aplicado a cualquier experimento de *microarrays*, sino que debe ser elegido en función del tipo de diseño experimental, del número de réplicas y de variables externas. Es necesario encontrar un equilibrio entre los dos tipos de errores de inferencia que se pueden cometer durante la aceptación o rechazo de la hipótesis nula, en este caso, que no existan diferencias en la expresión entre dos grupos. El porcentaje de falsos negativos (β) se puede controlar aumentando el número de réplicas, mientras que se establece de antemano una proporción de falsos positivos, habitualmente el 5% ($\alpha = 0.05$) (Nadon & Shoemaker, 2002). Esto supone un problema en el caso de evaluar miles de variables al mismo tiempo (*multiple testing*), como en el caso de los *microarrays*, ya que se asumiría que aún en el caso de no encontrar diferencias significativas, el 5% de los genes por azar podrían alcanzar una significancia estadística (Knudsen, 2002). Así, en nuestro estudio, si se aplica en un test de la T para determinar diferencias significativas en las 3,055 sondas seleccionadas tras el proceso de filtrado, se obtendrían 150 sondas falsas positivas por azar.

Se aplicaron dos métodos estadísticos para valorar las diferencias de expresión génica entre los dos grupos: i) un test estándar de la T de dos colas para varianzas desiguales y ii) SAM, un método basado en permutaciones que ha sido específicamente diseñado para el análisis de datos de *microarrays*. Este último método además permite estimar la tasa de falsos positivos, es decir, la proporción de genes identificados por azar. Mediante el test de la T se detectaron 391 sondas con expresión diferencial entre los dos grupos ($p < 0.05$), 5 de las cuales presentaban $p < 0.001$, sin embargo, ninguna de ellas alcanzó la significancia estadística cuando se aplicó una corrección frente a múltiples hipótesis (*p-ajustada* < 0.05). Más que reflejar una ausencia de efecto biológico, esta falta de significancia estadística puede reflejar poca sensibilidad (aumento de los falsos negativos) debido al bajo número de muestras. En otros estudios de *microarrays* donde emplean biopsias humanas, con pequeño tamaño muestral, alta variabilidad entre las muestras y modestas diferencias de expresión, tal como en nuestro caso, no encuentran diferencias tras aplicar un test similar con corrección del FDR (Miklos & Maleszka, 2004; Mootha *et al.*, 2003; Patti *et al.*, 2003). Por esta razón, hemos aplicado un segundo método estadístico alternativo al test de la T, el método SAM, que permite utilizar un número muestral menor. Con este segundo método, 78 de las 391 sondas diferencialmente expresadas mantuvieron significancia estadística (FDR $< 0.5\%$). Estas 78

sondas cumplieron los siguientes criterios: i) un cambio de expresión con significancia estadística en los dos métodos estadísticos utilizados, ii) un ratio de inducción o represión ≥ 1.5 , iii) un resultado coincidente cuando el análisis se realiza con los valores de señal normalizados por RMA.

En las tablas 4.5 y 4.6, se detalla la lista de 78 sondas cuya expresión se ve afectada por el fenotipo de PCOS en el tejido adiposo omental. 42 de las 78 sondas, las cuales representan 39 genes diferentes, muestran una expresión aumentada en el tejido adiposo omental de los pacientes PCOS con respecto a las mujeres control. El resto de las sondas (36 sondas), representando 24 genes, tienen menor expresión en pacientes PCOS con respecto a mujeres control (ratio < 0.66). La identidad de las sondas fue verificada utilizando la herramienta BLAST del NCBI y del Ensembl. En los casos en los que se encontraron discrepancias entre los datos de Affymetrix y las bases de datos, se verificó que las sondas estaban incluidas en la secuencia codificante del gen mediante RT-PCR y cebadores específicos (datos no mostrados).

En este trabajo hemos identificado un grupo de 63 genes cuya expresión se ve afectada por el fenotipo de PCOS. En los análisis de *microarrays*, se suele asumir que los genes que muestran las mayores diferencias en la expresión entre dos condiciones tienen presumiblemente mayor importancia biológica. La idea de que cambios de expresión mayores a 2 veces son significativos está ampliamente extendida, sin embargo este umbral fue fijado en los primeros trabajos realizados con *microarrays* para unos experimentos concretos (DeRisi *et al.*, 1996). Sin embargo, en muchos casos, un cambio de 2 o mayor en la expresión de un gen puede no ser relevante con respecto al fenotipo y viceversa, genes con importantes efectos en el fenotipo pueden ser pasados por alto en la maraña de datos de un *microarray* (Miklos & Maleszka, 2004). Con esta idea y considerando que los cambios en la expresión observados en nuestro modelo eran modestos, hemos decidido utilizar un umbral de cambio ligeramente inferior a 2, con el fin de no perder información. Ninguno de los genes con cambios significativos en su expresión entre los dos fenotipos muestra cambios superiores a 3. Hay que señalar, sin embargo, que los cambios de expresión son consistentes entre los dos grupos de individuos comparados. De manera similar a nuestro trabajo, en los anteriores estudios de *microarrays* realizados en el PCOS se observa que los cambios de expresión en tejido ovárico y en células tecaes son menores de lo esperado dadas las importantes disfunciones ováricas que presentan las pacientes (Jansen *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2003).

Tabla 4.5. Transcritos con expresión disminuida de forma significativa en tejido adiposo omental de pacientes PCOS obesas en comparación con mujeres obesas no hiperandrogénicas.

Sonda Affymetrix	Nombre del Gen	Símbolo del Gen	Ratio*	Cromosoma	Función
200974_at	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ACTA2	0.60	10q23.3	Citoesqueleto
202274_at	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	ACTG2	0.48	2p13.1	Citoesqueleto
203180_at	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	ALDH1A3	0.48	15q26.3	Detoxificación de aldehídos
222168_at	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	ALDH1A3	0.22	15q26.3	Detoxificación de aldehídos
202357_s_at	B-factor, properdin	BF	0.60	6p21.3	Activación del complemento
210916_s_at	CD44 antigen	CD44	0.60	11p13	Unión a ácido hialurónico
218182_s_at	Claudin 1	CLDN1	0.51	3q28-q29	Adhesión celular
204619_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.60	5q14.3	Unión a ácido hialurónico
204620_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.51	5q14.3	Unión a ácido hialurónico
211571_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.43	5q14.3	Unión a ácido hialurónico
215646_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.48	5q14.3	Unión a ácido hialurónico
221731_x_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.47	5q14.3	Unión a ácido hialurónico
209395_at	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	CHI3L1	0.51	1q32.1	Unión a azúcares
209396_s_at	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	CHI3L1	0.42	1q32.1	Unión a azúcares
204602_at	Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	DKK1	0.42	10q11.2	Señalización de Wnt
214511_x_at	Fc fragment of IgG, Ia, receptor for (CD64)	FCGR1A	0.59	1q21.2	Respuesta inmune
216950_s_at	Fc fragment of IgG, Ia, receptor for (CD64)	FCGR1A	0.62	1q21.2	Respuesta inmune
204419_x_at	Hemoglobin, gamma A	HBG1	0.51	11p15.5	
203290_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ α 1	HLA-DQA1	0.60	6p21.3	Respuesta inmune
209823_x_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ β 1	HLA-DQB1	0.62	6p21.3	Respuesta inmune
221491_x_at	Major histocompatibility complex, class II, DR β 3	HLA-DRB3	0.43	6p21.3	Respuesta inmune
216207_x_at	Immunoglobulin kappa constant	IGKC	0.61	2p12	Respuesta inmune
214669_x_at	Immunoglobulin kappa light chain mRNA	IGKV	0.55	2p12	Respuesta inmune
214677_x_at	Immunoglobulin lambda joining 3	IGLJ3	0.64	22q11.2	Respuesta inmune
217148_x_at	Immunoglobulin lambda joining 3	IGLJ3	0.56	22q11.2	Respuesta inmune
214777_at	Immunoglobulin kappa light chain VKJ region	IGLV	0.40	2p12	Respuesta inmune
216576_x_at	Clone H10 anti-HLA-A2 immunoglobulin light chain	IGLV	0.44	2p12	Respuesta inmune
215176_x_at	Immunoglobulin light chain variable region	IGLV	0.41	2p12	Respuesta inmune
222379_at	Potassium voltage-gated channel, member 4	KCNE4	0.58	2q36.3	Transporte de K ⁺
201496_x_at	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	MYH11	0.38	16p13.13	Citoesqueleto
201497_x_at	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	MYH11	0.44	16p13.13	Citoesqueleto
207961_x_at	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	MYH11	0.50	16p13.13	Citoesqueleto
205729_at	Oncostatin M receptor	OSMR	0.58	5p13.1	Proliferación celular
204939_s_at	Phospholamban	PLN	0.55	6q22.1	Transporte de Ca ⁺²
204338_s_at	Regulator of G-protein signalling 4	RGS4	0.43	1q23.3	Transducción de señal
201645_at	Tenascin C (hexabrachion)	TNC	0.47	9q33	Adhesión celular

*Ratio de expresión entre los dos grupos (PCOS/Controles).

Tabla 4.6. Tránscrios con expresión aumentada de forma significativa en tejido adiposo omental de pacientes PCOS obesas en comparación con mujeres obesas no hiperandrogénicas.

Sonda Affymetrix	Nombre del Gen	Símbolo	Ratio*	Cromosoma	Función
205969_at	Arylacetamide deacetylase (esterase)	AADAC	1.80	3q21.3-q25.2	Metabolismo lipídico
207328_at	Arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15	1.66	17p13.3	Metabolismo lipídico
209788_s_at	Type 1 TNF receptor shedding aminopeptidase	ARTS-1	2.23	5q15	Adipogénesis
219866_at	Chloride intracellular channel 5	CLIC5	1.51	6p12.1-21.1	Transporte de cloro
213998_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	1.61	22q13.1	Helicasa de ARN
219237_s_at	DnaJ (HSP40) homolog, subfamily B member 14	DNAJB14	1.68	4q23	Respuesta a estrés
220392_at	Early B-cell factor 2	EBF2	1.72	8p21.2	Transcripción
201693_s_at	Early growth response 1	EGR1	1.51	5q31.1	Transcripción
205066_s_at	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	ENPP1	1.70	6q22-q23	Señalización insulina
206404_at	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	FGF9	1.54	13q11-q12	Factor de crecimiento
218930_s_at	Hypothetical protein FLJ111273	FLJ111273	1.51	7p21.3	
219054_at	Hypothetical protein FLJ14054	FLJ14054	1.73	5p13.3	
204358_s_at	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	FLRT2	1.67	14q24-q32	Receptor
219250_s_at	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	FLRT3	1.57	20p11	Receptor
202554_s_at	Glutathione S-transferase M3	GSTM3	1.71	1p13.3	Detoxificación
213831_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ α 1	HLA-DQA1	2.09	6p21.3	Respuesta inmune
205404_at	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1	1.50	1q32-q41	Metabolismo del cortisol
215698_at	Jumonji, AT rich interactive domain 1A	JARID1A	2.05	12p11	Transcripción
202040_s_at	Jumonji, AT rich interactive domain 1A	JARID1A	1.58	12p11	Transcripción
207092_at	Leptin (obesity homolog, mouse)	LEP	1.50	7q31.3	Homeostasis energética
219759_at	Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	LRAP	1.55	5q15	Procesamiento antígenos
213764_s_at	Microfibrillar associated protein 5	MFAP5	1.72	12p13.1	Matriz extracelular
213765_at	Microfibrillar associated protein 5	MFAP5	1.66	12p13.1	Matriz extracelular
219789_at	Natriuretic peptide receptor C	NPR3	2.25	5p14-p13	Receptor
201467_s_at	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1	1.78	16q22.1	Detoxificación
201468_s_at	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1	1.78	16q22.1	Detoxificación
209750_at	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	NR1D2	1.51	3p24.2	Receptor H. esteroideas
214680_at	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NTRK2	1.60	9q22.1	Receptor neurotrofinas
203803_at	Prenylcysteine oxidase 1	PCYOX1	1.51	2p13.3	Metabolismo
222317_at	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	PDE3B	1.52	11p15.1	Señalización insulina
212249_at	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, p85 α	PIK3R1	1.61	5q13.1	Señalización insulina
212629_s_at	Protein kinase C-like 2	PKN2	1.70	1p22.2	Transducción de señal
214449_s_at	Ras homolog gene family, member Q	RHOQ	1.63	2p21	Señalización insulina
200832_s_at	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	SCD	1.61	10q23-q24	Síntesis de ácidos grasos
221473_x_at	Serine incorporator 3	SERINC3	1.62	20q13.1	Desconocida
207057_at	Solute carrier family 16, member 7	SLC16A7	1.61	12q13	Transporte de piruvato
221276_s_at	Intermediate filament protein syncoilin	SYNC	1.52	1p34.3	Proteína estructural
212382_at	Transcription factor 4	TCF4	1.67	18q21.1	Transcripción
204731_at	Transforming growth factor, beta receptor III	TGFBR3	1.61	1p33-p32	Señalización TGF β
221496_s_at	Transducer of ERBB2, 2	TOB2	1.96	22q13.2	Proliferación celular
201387_s_at	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1	UCHL1	1.51	4p14	Ubiquitinación
206658_at	Uroplakin 3B	UPK3B	1.74	7q11.2	Desconocida

* Ratio entre los dos grupos (PCOS/Controles).

4.2.4. Validación de los niveles de expresión por RT-PCR cuantitativa.

Hemos empleado la técnica de PCR a tiempo real para analizar los cambios de expresión de una selección de 50 genes desregulados en el tejido adiposo con PCOS. Se analizó por cuádruplicado el ARN total procedente de tejido adiposo omental de ocho pacientes con PCOS y siete controles. Se llevaron a cabo tres análisis independientes con los distintos controles endógenos seleccionados (GADPH, PPIA y GUSB), comprobándose que se obtenían resultados similares independientemente del gen empleado en la normalización de los datos de expresión. Tal como se muestra en las Tablas 4.7 y 4.8, la mayoría de los genes muestra cambios en su expresión concordantes con los obtenidos en el análisis de *microarrays*. 20 de los genes estudiados por RT-PCR cuantitativa presentaron diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney ($p\text{-valor} < 0.05$). Por tanto, la validación de los niveles de expresión génica con una técnica independiente confirma la fiabilidad del experimento de *microarrays*.

Gen	Nombre del Gen	Ratio (PCOS / Controles)	
		Microarray	RT-qPCR
ACTA2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0.60	0.52*
ACTG2	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0.48	0.40*
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	0.22-0.48 ^a	0.52
BF	B-factor, properdin	0.60	0.49
CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	0.60	0.52
CLDN1	Claudin 1	0.51	0.66
CSPG2	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	0.43-0.51 ^a	0.51
CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	0.42-0.51 ^a	0.33*
DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	0.42	0.33*
FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	0.59-0.62 ^a	0.47
HLA-DQB1	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	0.62	1.41*
HLA-DRB3	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	0.43	0.04*
KCNE4	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	0.58	0.54
MYH11	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	0.38-0.50 ^a	0.49*
OSMR	Oncostatin M receptor	0.58	0.74
PLN	Phospholamban	0.55	0.63
RGS4	Regulator of G-protein signalling 4	0.43	0.76
TNC	Tenascin C (hexabrachion)	0.47	0.76

Tabla 4.8. Genes con expresión disminuida en tejido adiposo omental de individuos con PCOS. El cambio en la expresión para cada gen, expresado como ratio (PCOS/Controles), ha sido calculado por los métodos SAM y $\Delta\Delta C_t$ a partir de los datos normalizados de *microarrays* y RT-PCR cuantitativa, respectivamente. Los valores de expresión obtenidos en el análisis de RT-qPCR están referidos al gen control PPIA. * $p\text{-valor} < 0.05$ en test U de Mann-Whitney. ^a. Genes representados por varias sondas en el *microarray*. Se indican los valores mínimo y máximo de ratio.

Gen	Nombre del Gen	Ratio (PCOS/Controles)	
		Microarray	RT-qPCR
AADAC	Arylacetamide deacetylase (esterase)	1.80	0.97
ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase	1.66	1.43
CLIC5	Chloride intracellular channel 5	1.51	1.56
DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	1.61	1.02
EBF2	Early B-cell factor 2	1.72	1.53*
ENPP1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	1.70	1.46
FGF9	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	1.54	1.38
FLJ11273	Hypothetical protein FLJ11273	1.51	1.24*
FLJ14054	Hypothetical protein FLJ14054	1.73	2.16*
FLRT3	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	1.57	1.60
GSTM3	Glutathione S-transferase M3 (brain)	1.71	1.75*
HSD11B1	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	1.50	1.88*
JARID1A	Jumonji, AT rich interactive domain 1A (RBBP2-like)	1.58 / 2.05 ^a	1.09
LEP	Leptin (obesity homolog, mouse)	1.50	1.79
LRAP	Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	1.55	2.25*
MFAP5	Microfibrillar associated protein 5	1.66 / 1.72 ^a	0.96
NPR3	Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C	2.25	2.19*
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1.78	2.25*
NR1D2	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	1.51	1.35
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	1.60	1.29
PCYOX1	Prenylcysteine oxidase 1	1.51	1.27*
PDE3B	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	1.52	1.53
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 α)	1.61	1.43*
PKN2	Protein kinase C-like 2	1.70	1.07
RHOQ	Ras homolog gene family, member Q	1.63	1.18
SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	1.61	1.86*
SYNC	Intermediate filament protein syncoilin	1.52	1.69*
TDE1	Tumor differentially expressed 1	1.62	1.10
TGFBR3	Transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa)	1.61	1.4
TOB2	Transducer of ERBB2, 2	1.96	1.07
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	1.51	1.77*
UPK3B	Uroplakin 3B	1.74	0.89

Tabla 4.7. Genes con expresión aumentada en tejido adiposo omental de individuos con PCOS. El nivel de inducción para cada gen ha sido calculado por los métodos SAM y $\Delta\Delta C_t$ a partir de los datos normalizados de *microarrays* y RT-PCR cuantitativa, respectivamente. Los valores de expresión obtenidos en el análisis de RT-qPCR están referidos al gen control PPIA. * *p*-valor < 0.05 en test U de Mann-Whitney. ^a. Genes representados por dos sondas en el *microarray*. Se indica el ratio obtenido para cada una de las sondas.

En muchas ocasiones, sólo los genes con cambios de expresión mayores de 2 pueden ser validados por RT-PCR cuantitativa. En nuestro caso, esto no se cumple, ya que hemos podido validar varios genes que muestran cambios de expresión en los *arrays* inferiores a 2 veces, tales como HSD11B1, NQO1 o SCD. En sentido contrario, el gen ARTS1 presenta un nivel de cambio mayor a 2 veces en los *arrays*, pero no se valida con la técnica de RT-*q*PCR. Las discrepancias observadas en el nivel de cambio de expresión en algunos de los genes pueden ser debidas a un diseño inadecuado de las sondas utilizadas en la PCR cuantitativa. Las sondas de Affymetrix suelen estar diseñadas frente a la región 3' de los genes diana y, dentro del *array*, se incluyen sondas frente a distintas formas de *splicing*; por el contrario, las sondas Taqman de Applied Biosystem disponibles en el momento de diseñar este experimento, están diseñadas preferentemente frente a la región 5' de los genes, lo que permite una menor discriminación de los distintos transcritos de un mismo gen.

4.3. BÚSQUEDA DE RUTAS METABÓLICAS O PROCESOS BIOLÓGICOS DESREGULADOS EN EL PCOS.

El principal desafío de los análisis de expresión con *microarrays* de ADN no reside en la simple obtención de perfiles de expresión génica, sino más bien en su interpretación e integración dentro del contexto biológico en estudio. Las alteraciones en la expresión génica no sólo se manifiestan a nivel de genes individuales, sino también de forma más amplia afectando a rutas de señalización, grupos funcionales de genes o redes de regulación génica. Por ello, en este trabajo, hemos querido centrarnos también en la búsqueda de procesos biológicos, moleculares o reguladores que puedan estar significativamente alterados en el tejido adiposo de pacientes con PCOS. Partiendo de datos de expresión de *microarrays*, existen varias estrategias enfocadas a conseguir este objetivo, entre ellas, la más utilizada consiste en el estudio de las rutas en las que participan los genes con expresión diferencial, los cuales han sido previamente seleccionados según un determinado nivel umbral de desregulación. Para extraer el contenido biológico de una lista de genes desregulados se utilizan distintas fuentes de información como la base de datos de términos ontológicos del consorcio de *Gene Ontology* (GO), bases de datos de regulación génica o de rutas metabólicas.

4.3.1. Análisis de ontologías.

Con el fin de identificar funciones moleculares o procesos biológicos que pudieran estar alterados en el PCOS, hemos analizado los términos de GO asociados a cada una de las sondas diferencialmente expresadas entre los dos grupos comparados. En base a sus funciones biológicas, las sondas se agruparon en varias categorías: *procesos celulares* (46.2 %), *metabolismo* (34.6 %), *desarrollo* (24.4 %) y *regulación* (12.8 %). Según su función molecular, la mayoría presentan *función de unión* (46.2 %), principalmente a proteínas y a ácidos nucleicos. Además, el 30 % de las sondas presentan una *actividad catalítica*, particularmente *actividad hidrolasa* o *actividad oxidorreductasa*.

Asimismo, se buscaron términos ontológicos que estuvieran diferencialmente representados de forma significativa (χ^2 , p -ajustada < 0.05) entre los genes desregulados en PCOS. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 4.9. Hay que destacar que varios de los términos de GO que se encuentran significativamente sobrerrepresentados en el fenotipo PCOS en comparación con el fenotipo control, están relacionados con *actividad oxidorreductasa*. Los términos de GO relacionados con *adhesión celular*, *reconocimiento celular* y *defensa* están significativamente sobrerrepresentados en los controles, y por tanto dichos términos se encontrarían reprimidos en el fenotipo PCOS.

La base de datos de *Gene Ontology* no está completa sino que se encuentra en continuo proceso de renovación a medida que aumenta el conocimiento funcional de los genes. En este sentido, algunos de los genes destacados en nuestro trabajo, como los que codifican para proteínas hipotéticas, no presentan anotación de GO y, por ello, es necesario tener en cuenta que el resultado aquí expuesto puede variar a medida que la base de ontologías se vaya actualizando.

Grupo GO	Término GO	Observados	Total	χ^2	p-valor
<i>Procesos aumentados en PCOS</i>					
Proceso Biológico	Biosíntesis de ácido nítrico	2	19	90.86	0.0
	Respuesta a toxinas	2	22	77.95	0.0
	Metabolismo de xenobióticos	2	55	28.93	0.0
	Respuesta a sustancias químicas	3	314	7.73	0.013
	Biosíntesis de ácidos grasos	2	80	18.76	0.002
	Transporte de electrones	2	457	4	0.021
Función Molecular	Citocromo b5-reductasa	2	9	198.1	0.0
	Actividad NAD(P)H deshidrogenasa (quinona)	2	50	450.0	0.0
	Alanil-aminopeptidasa de membrana	2	20	87.0	0.0
	Anclaje de proteínas	2	109	13.0	0.0
	Unión a iones Fe	2	94	15.6	0.0
	Actividad oxidorreductasa	6	815	10.4	0.0
	Actividad de receptor	2	261	3.6	0.0
	Componente estructural de matriz extracelular	2	151	8.4	9.9 E-4
	Actividad de factor de crecimiento	2	246	4.0	0.01292
	Componente Celular				
Componente Celular	Espacio extracelular	4	437	7.9	0.00565
	Matriz extracelular	4	494	6.4	0.00651
	Membrana	17	5839	1.3	0.047
<i>Procesos disminuidos en PCOS</i>					
Proceso Biológico	Adhesión célula-célula	6	248	5.0	0
	Reconocimiento celular	5	27	476.7	0.0
	Presentación de antígenos, vía MHC de clase II	9	33	137.45	0.0
	Respuesta inmune	7	1144	11.47	1.0 E-5
	Desarrollo	11	2805	7.25	6.0 E-4
Función Molecular	Unión a ácido hialurónico	6	32	602.3	0.0
	Unión a IgGs	2	10	105.02	0.0
	Actividad de receptor de MHC de clase II	3	36	130.58	0.0
	Unión a azúcares	7	189	129	0.0
	Actividad motora	5	203	58.19	0.0
	Unión a actina	3	377	7.87	0.00118
	Unión a ión Ca ⁺²	5	879	7.5	0.00135
Componente Celular	Matriz extracelular	8	494	6.4	0.0
	Filamento de actina	2	37	56.0	0.047

Tabla 4.9. Términos de GO representados diferencialmente entre los genes con expresión alterada en PCOS. Sólo las categorías de GO con p -valor < 0.05 , ajustado por FDR, en un test χ^2 se han considerado como significativamente representadas. Se indican el número total de genes presentes en el *microarray* HG-U133A, así como el número de genes desregulados en las pacientes PCOS, clasificados dentro de cada categoría GO.

4.3.2. Asociaciones de coexpresión y correulación entre los genes desregulados.

Los métodos de agrupamiento facilitan el análisis de los perfiles de expresión y proporcionan información sobre la coexpresión de genes bajo una determinada condición. Con el fin de analizar las relaciones de coexpresión entre genes diferencialmente expresados en PCOS, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico. Tal como se muestra en la Figura 4.2, hemos obtenido varios grupos de genes coexpresados en dos grandes ramas, una conteniendo 6 grupos de genes sobreexpresados y otra con 4 grupos de genes reprimidos. Varias sondas del mismo gen y genes relacionados funcionalmente aparecen en el mismo grupo, lo cual nos da una idea de la fiabilidad de los patrones de expresión encontrados.

Partiendo de la asunción de que un grupo de genes coexpresados suelen presentar correulación y que genes correulados suelen compartir motivos similares de regulación, se buscaron elementos *cis*-reguladores que fueran comunes para los distintos grupos de coexpresión. En la Figura 4.2, se muestra de forma más detallada algunas de las asociaciones significativas encontradas entre grupos de genes coexpresados y la localización de sitios putativos de unión a factores de transcripción (TFBSs). Se han considerado sólo aquellos TFBSs que están sobrerrepresentados de forma significativa en la mayoría de los genes coexpresados.

Este análisis muestra una sobrerrepresentación estadísticamente significativa de sitios de unión para HNF4, FOXI1 y FOXA2, factores de transcripción previamente implicados en la patogénesis de la resistencia a insulina y DMT2 (Odom *et al.*, 2004). FOXA2, también denominado HNF3 β , regula la oxidación de ácidos grasos en el hígado durante los periodos de ayuno de forma dependiente de insulina (Wolfrum *et al.*, 2003). Además, la actividad transcripcional de FOXA2 se encuentra inhibida en estados de resistencia a insulina (Wolfrum *et al.*, 2004). Nuestros resultados indican que algunos genes reprimidos en las pacientes PCOS podrían ser dianas transcripcionales de FOXA2 (grupo I), lo que podría evidenciar un posible papel de FOXA2 en el PCOS asociado a las alteraciones en la función insulínica. Dentro de estos genes correulados por FOXA2 se incluyen genes de actina y miosina, componentes del citoesqueleto que intervienen en el proceso de transporte de GLUT4 mediado por insulina en adipocitos (Watson *et al.*, 2004).

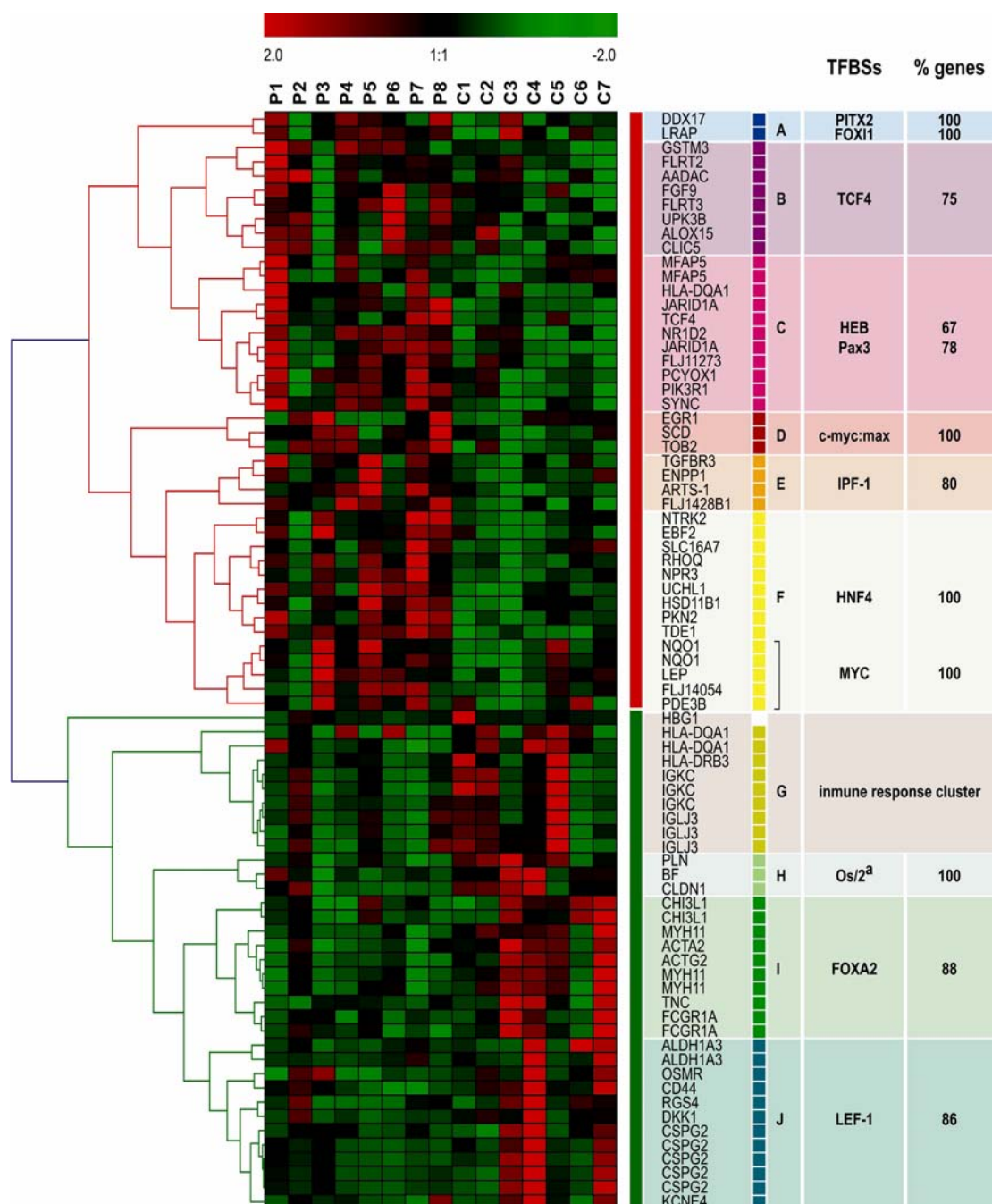


Figura 4.2. Agrupamiento jerárquico de los genes desregulados en el tejido adiposo omental de pacientes PCOS (P1-8) y mujeres control (C1-7). Los genes se agruparon mediante el método de ligamiento promedio en función a la semejanza encontrada entre sus patrones de expresión, medida por la correlación de Pearson. Se han incluido las 78 sondas de Affymetrix previamente seleccionadas por sus cambios significativos de expresión en las muestras PCOS. Las sondas y las muestras experimentales están distribuidas en filas y en columnas, respectivamente. Cada celda de la matriz de datos representa el valor en log2 del ratio de la abundancia de cada transcrito con respecto a la mediana de la abundancia para dicho gen entre todas las muestras. Las intensidades crecientes en color verde indican una disminución de la expresión en las pacientes mientras que el aumento en la expresión viene indicado en rojo. A la derecha de la figura, se indican los agrupamientos génicos obtenidos (A-J), representados por barras verticales en distintos colores, junto con los factores de transcripción que presentan posibles sitios de unión sobrerrepresentados de forma significativa en cada grupo de genes coexpresados (p -valor < 0.05). Se indica el porcentaje de genes de cada grupo que presentan sitios de unión al correspondiente factor. ^a No significativo ($p = 0.06$).

De la misma manera, varios grupos génicos muestran una sobrerrepresentación para efectores transcripcionales de la ruta de señalización mediada por Wnt/ β -catenina, tales como TCF4, LEF1 y TCF1 (éste último en el grupo B, dato no mostrado en la figura 4.2). Es interesante destacar que el factor de transcripción TCF4 es uno de los genes con expresión aumentada en las pacientes con PCOS (Tabla 4.6). Entre las dianas transcripcionales que han sido identificadas por este trabajo *in silico* como posibles efectores de la ruta de Wnt, FGF9, CD44 y DKK1 habían sido previamente descritos como genes regulados por dicha ruta (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2003). También se ha observado que existe una sobrerrepresentación significativa de sitios de unión a Myc en los tres genes del grupo D y en un subgrupo muy homogéneo de genes en el grupo F. Myc es otro gen diana de la función transcripcional mediada por β -catenina/TCF, lo que puede indicar que el aumento en la expresión de genes regulados por Myc podría ser un efecto secundario a la activación de la ruta de Wnt/ β -catenina en el tejido adiposo de pacientes PCOS.

Estos resultados indican que algunos de estos grupos de genes coexpresados comparten sitios de unión a factores de transcripción y, por tanto, presentan una regulación en común. La desregulación en su expresión podría ser un reflejo de posibles alteraciones en la función transcripcional de dicho factor. Sin embargo, tenemos que ser cautos con esta inferencia debido a varias razones. Primero, aunque el hecho de compartir unión a un determinado factor de transcripción es un buen indicio de corregulación (Park *et al.*, 2002), la regulación transcripcional *in vivo* está influenciada por otros factores adicionales, puesto que otros correguladores, tanto activadores como represores, pueden estar modulando la acción de un determinado factor transcripcional. Por otra parte, en la localización de TFBSs en regiones genómicas de genes coexpresados se buscan secuencias patrón de pequeño número de bases y se utiliza un método estadístico para determinar el grado de significancia, de manera que si no se utiliza un control de falsos positivos lo suficientemente estricto, se podrían estar considerando falsos elementos *cis*-reguladores. Por todo ello, estos resultados de corregulación deben ser interpretados con cautela como nuevas hipótesis que podrían explicar la desregulación génica observada en el PCOS y que tendrán que ser verificadas con posterioridad.

4.3.3. *Análisis a priori de datos de microarrays.*

Las enfermedades complejas suelen ser el resultado de pequeñas alteraciones coordinadas en la expresión o en la actividad de múltiples proteínas, por ello los cambios de expresión en los genes implicados no siempre alcanzan el umbral de significación necesario para que puedan destacar en un análisis de *microarrays*. En estos casos, algunos autores indican que la estrategia *a posteriori* de identificar posibles rutas alteradas, es decir, una vez identificados genes con expresión desregulada, puede que no sea la más adecuada para poner de manifiesto alteraciones relevantes en el estudio de patologías complejas (Mootha *et al.*, 2003). Otros métodos de análisis desarrollados recientemente, como FatiScan o GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), permiten detectar pequeños cambios coordinados en la expresión de grupos de genes relacionados funcionalmente mediante la búsqueda de “enriquecimientos” de genes para una determinada ruta o proceso biológico entre los genes con mayores diferencias de expresión en el sistema en estudio, sin establecer cortes artificiosos para definir la desregulación génica (Al-Shahrour *et al.*, 2005a; Subramanian *et al.*, 2005).

Siguiendo este argumento, hemos utilizado el método denominado FatiScan para identificar cambios significativos en genes relacionados biológicamente que estén asociados al fenotipo PCOS. A partir de los datos normalizados de expresión, obtenidos en el experimento de *microarrays*, se eliminaron las sondas que estuvieran “ausentes” en todas las muestras. Las aproximadamente 12,000 sondas restantes fueron ordenadas en función de su expresión diferencial en PCOS, valorada mediante el test de la T utilizando la herramienta POMELO, tal como se esquematiza en la Figura 4.3A. Mediante un test exacto de Fischer, se evaluó la existencia de enriquecimientos significativos para términos de GO entre las sondas con mayor expresión para cada uno de los 50 fraccionamientos que fueron realizados en la lista de sondas (Figura 4.3B). Aquellos términos GO con significativamente mayor o menor representación en varios de los fraccionamientos aparecen representados en la Figura 4.4. Estos gráficos representan las diferencias en los porcentajes para un determinado término de GO en los dos grupos de genes resultantes de cada fracción en función del valor del estadístico utilizado para realizar la partición y permiten detectar términos de GO con distribuciones asimétricas dentro de la lista de genes. Este proceso permite identificar grupos de genes con una relación funcional que se expresan diferencialmente en bloque (Al-Shahrour *et al.*, 2005a).

Este análisis se llevó a cabo asimismo utilizando la información biológica de las rutas metabólicas anotadas en la base de datos del KEGG, obteniéndose una única ruta metabólica

con representación diferencial, el *Metabolismo del Glutation* (Figura 4.4A). En concordancia con este resultado, el término ontológico *reacción de conjugación del glutatión* está significativamente sobrerrepresentado entre los genes con expresión aumentada en las muestras con PCOS. Ambas nomenclaturas engloban los cinco genes de la familia GSTM (GSTM1-5), que codifican para enzimas glutatión S-transferasas de clase M responsables de las reacciones de conjugación del glutatión. La expresión de GSTM3 se encuentra significativamente aumentada en el PCOS, tal como había sido evidenciado por los análisis anteriores, sin embargo esta estrategia nos ha permitido detectar que, adicionalmente, otros genes de la misma familia presentan cambios de expresión (Figura 4.5), evidenciando la existencia de alteraciones coordinadas en su expresión en las pacientes con PCOS. Estos cinco genes constituyen una agrupación génica localizada en el cromosoma 1p13.3, de manera que tiene sentido que la expresión de todos ellos se encuentre alterada de forma coordinada.

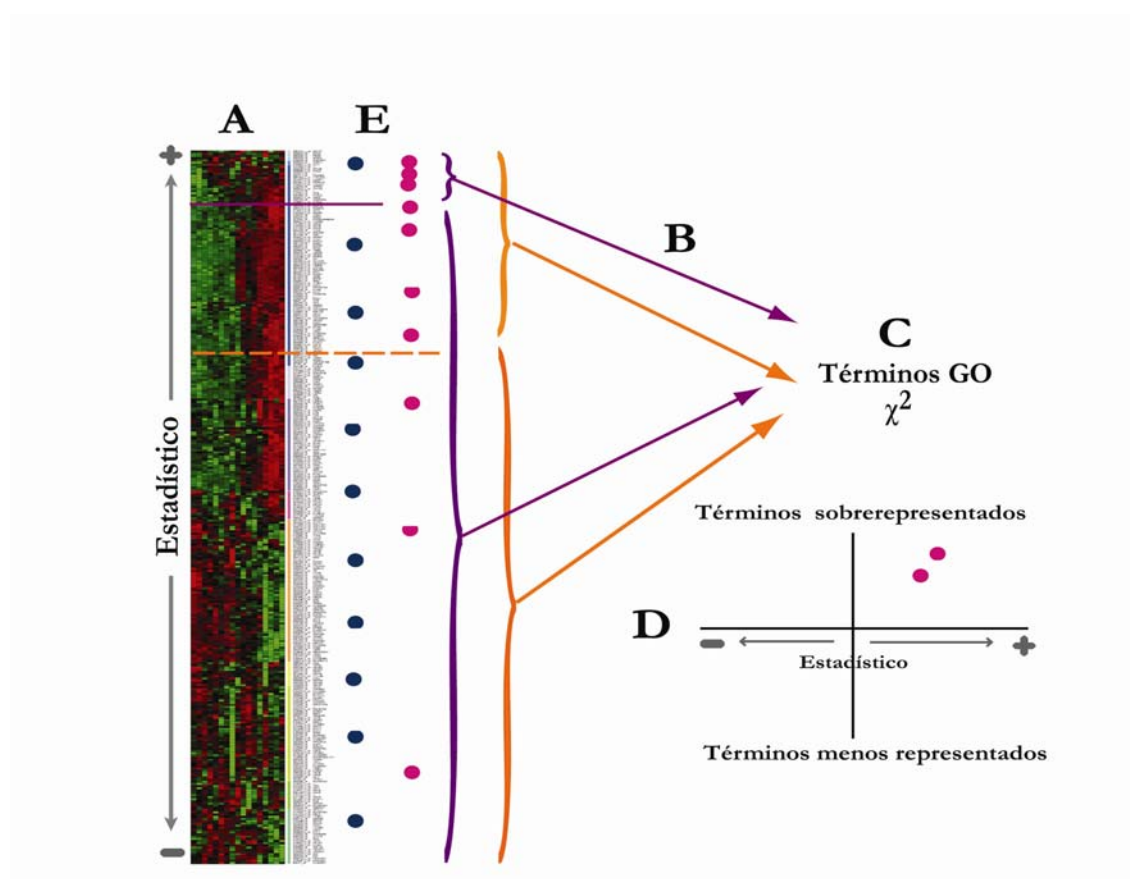


Figura 4.3. Esquema del método FatiScan. **A.** Ordenamiento de los genes en base a su expresión diferencial entre las dos condiciones estudiadas utilizando un test estadístico, en nuestro caso el test de la T. **B.** Obtención de los distintos fraccionamientos de la lista de genes en función del valor del estadístico. **C.** Determinación de los términos ontológicos representados diferencialmente para cada uno de los fraccionamientos obtenidos. **D.** Representación gráfica de los términos significativos bajo el valor del estadístico para detectar distribuciones asimétricas de los genes. **E.** Ejemplo de la distribución de dos términos entre el conjunto de genes. El término marcado en azul se encuentra uniformemente distribuido mientras que el marcado en rosa se distribuye de forma asimétrica entre los genes con una acumulación en uno de los extremos de la lista (Adaptado de Al-Shahrour, 2005).

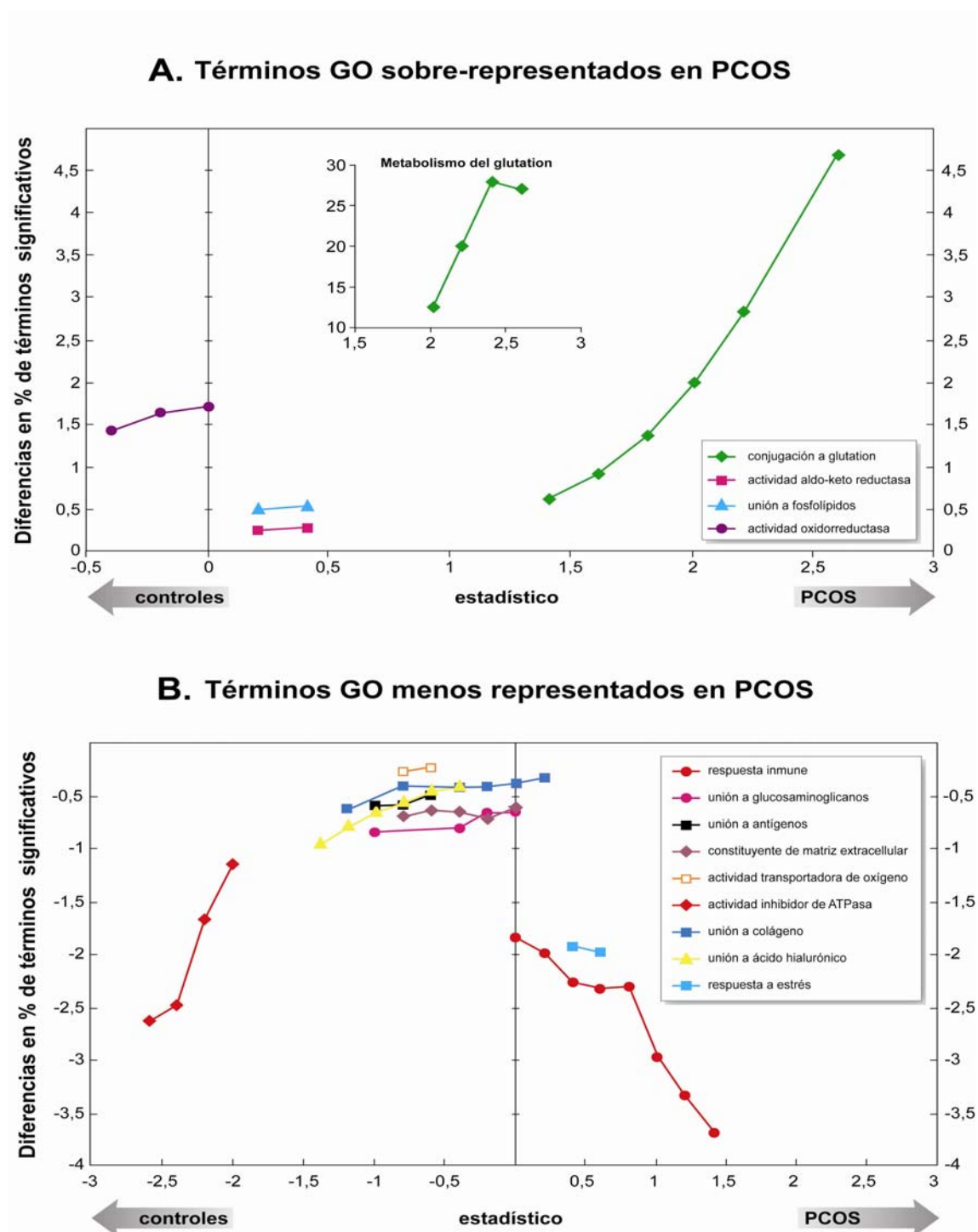
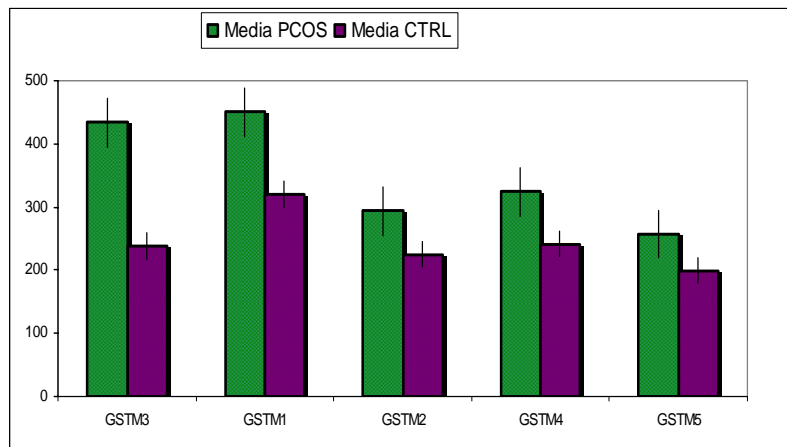


Figura 4.4. Términos de GO con mayor o menor representación en los genes diferencialmente expresados en las muestras con PCOS. **A.** Términos GO sobrerrepresentados significativamente en el PCOS. **B.** Términos GO con menor representación en las muestras con PCOS o, a la inversa, sobrerrepresentados en las muestras control. La parte derecha del eje X se corresponde con mayores niveles de expresión en los pacientes con PCOS, medidos por el estadístico t . La parte izquierda del mismo eje representa aquellos genes más expresados en los controles. El eje Y representa la diferencia entre los porcentajes para los términos GO en la partición correspondiente. Se han representado únicamente los “enriquecimientos” con significancia estadística (Test de Fischer; p -valor ajustado < 0.05) para varios fraccionamientos del valor del estadístico.

Figura 4.5. Niveles de expresión de la familia génica GSTM en el tejido adiposo omental. Se indica el valor medio de expresión de las ocho pacientes con PCOS y de las siete mujeres control para las sondas presentes en el *array* HG-U133A que codifican genes GSTM. En el caso de GSTM3, las pacientes con PCOS muestran un cambio significativo de expresión (ratio > 1.5).



De igual manera, genes englobados en la función molecular denominada *actividad aldo-keto reductasa* presentan una mayor representación en las muestras con PCOS. Es interesante destacar que dentro de este término se engloban varios miembros de la familia de enzimas aldo-keto reductasas de tipo 1C (AKR1C), mediadoras de la interconversión entre hormonas esteroideas y, por tanto, con una importante función en la síntesis local de andrógenos y estrógenos activos a partir de esteroides inactivos. Entre ellos, el gen AKR1C3, que codifica a la enzima 17 β -HSD de tipo 5, es el que muestra un mayor cambio en su expresión en las pacientes PCOS en comparación con las muestras control (ratio = 1.35). A pesar de que los cambios en su expresión sean modestos, pues, tal como se refleja en la representación gráfica (Figura 4.4A), el valor del estadístico es bajo, este análisis nos ha permitido encontrar cambios coordinados en la expresión de este grupo de genes relacionados funcionalmente, los cuales podrían jugar un papel en la fisiopatología del PCOS.

En la figura 4.4B, se muestran los términos con menor representación de genes en el fenotipo PCOS. Los valores negativos del estadístico se corresponden con genes con mayor expresión en el grupo control y unas diferencias negativas en los porcentajes significa que esos genes están más representados en las muestras control, es decir, menos representados en las pacientes con PCOS. Por lo tanto, el término *respuesta inmune* y, en particular, el término relacionado *unión a antígeno* están menos representados en los pacientes PCOS. Asimismo, los genes relacionados con funciones de adhesión celular, como los clasificados dentro de la actividad de *unión a ácido hialurónico*, *componente estructural de matriz extracelular* y *unión a colágeno* se pueden considerar que están reprimidos en PCOS.

Las observaciones recogidas con este método son consistentes con los resultados del análisis ontológico realizado exclusivamente con los genes identificados como

diferencialmente expresados en el PCOS. En resumen, se podría decir que existe una activación de oxidorreductasas en los pacientes PCOS (término GO *actividad oxidorreductasa*), incluyendo las actividades *aldo-keto reductasa*, *cytochromo b₅-reductasa* y una *actividad oxidorreductasa actuando sobre grupos donadores de sulfuros*. Estos dos últimos términos presentan significancia estadística para una sola partición (datos no mostrados). Por otro lado, se observa una tendencia a que procesos relacionados con respuesta inmune y comunicación celular estén atenuados en el fenotipo PCOS. Además de confirmar estos resultados, el análisis de “enriquecimiento” de genes nos ha permitido encontrar cambios consistentes en la expresión de grupos de genes relacionados funcionalmente, genes con actividad *aldo-keto reductasa* y genes de la familia GSTM; cambios que de otra manera hubieran pasado desapercibidos. Los modestos cambios de expresión no permiten el que estos genes destaquen como significativos en los tradicionales análisis de *microarrays*. Sin embargo, independientemente de la magnitud del cambio, cambios coordinados en la expresión de un grupo de genes relacionados pueden tener una significancia biológica en la patología.

A pesar del auge de las técnicas de *microarrays* en los últimos años, existen todavía aspectos a mejorar para llegar a un consenso que permita una mayor integración de los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación. Algunas de estas cuestiones son de carácter técnico y otras versan sobre los programas bioinformáticos necesarios para analizar de forma apropiada la información generada, pues el resultado final depende, en gran medida, del tratamiento estadístico de los datos. Las diferencias técnicas entre las distintas plataformas provoca que no existan protocolos de análisis estandarizados de modo que las estrategias a seguir, los criterios y los métodos de análisis varían de unos trabajos a otros, lo que dificulta la comparación de los resultados.

El empleo de muestras humanas añade limitaciones adicionales en el diseño y análisis estadístico de los *microarrays*, las cuales están relacionadas con la heterogeneidad genética de los individuos y con el limitado número de muestras de las que normalmente se dispone. Además, cuando el objeto de estudio del análisis con *microarrays* es una enfermedad compleja, como en el trabajo aquí expuesto, hay que sumar los problemas asociados a la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas (Miklos & Maleszka, 2004; Mootha *et al.*, 2003; Patti *et al.*, 2003). Otra variable de confusión que puede afectar a la interpretación de un estudio de *microarrays* es la heterogeneidad del tejido. En trabajos recientes, se ha visto que la variación debida a las diferentes poblaciones celulares en una biopsia de tejido humano puede exceder la variabilidad interindividual (Bakay *et al.*, 2002). La solución a este problema consistiría en

aislar los distintos tipos celulares que forman el tejido adiposo mediante microdissección por láser y estudiar su perfil de expresión génica por separado, pero desafortunadamente no hemos podido disponer de esta tecnología.

4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN EL TEJIDO ADIPOSO DE PACIENTES CON PCOS.

La información proporcionada por los estudios de expresión génica en tejido adiposo no puede ser directamente extrapolada a nivel proteico, dado que está ampliamente constatado que la correlación entre niveles de ARNm y proteínas suele ser pequeña (Nishizuka *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2004). Por ello, con objeto de determinar el posible efecto del PCOS sobre la expresión de proteínas en el tejido adiposo omental, y de complementar el anterior estudio de expresión génica, hemos llevado a cabo un análisis de expresión diferencial de proteínas mediante técnicas proteómicas ampliamente utilizadas, como son la electroforesis bidimensional (2DE) de proteínas y la espectrometría de masas.

4.4.1. Optimización de protocolos de 2DE en tejido adiposo.

En el momento de inicio de este trabajo, se habían utilizado técnicas de proteómica en el estudio de la adipogénesis en el modelo de células murinas 3T3L1 y en varios modelos animales (Kratchmarova *et al.*, 2002; Lanne *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2001); sin embargo no existía publicado ningún estudio sobre el proteoma del tejido adiposo humano. Por ello, hemos desarrollado protocolos para la separación de proteínas extraídas de biopsias de tejido adiposo omental en geles 2DE con suficiente calidad para poder llevar a cabo estudios de expresión diferencial de proteínas.

El hecho de que el tejido adiposo empleado en este estudio provenga de mujeres obesas dificulta la solubilización de las proteínas debido a su alto contenido en triglicéridos (más del 50% del volumen). Esto implica, además, que sea necesario una mayor cantidad de tejido para obtener la cantidad de proteína necesaria para llevar a cabo un estudio proteómico completo. Estas son algunas de las razones por las cuales la aplicación de protocolos específicos de extracción de proteínas de tejido adiposo de ratón utilizados en trabajos previos (Lanne *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2001), no dieran resultados óptimos con nuestras muestras.

En la técnica de 2DE, es importante obtener una representación lo más completa posible de las proteínas del tejido junto con un patrón claro y reproducible de las muestras a estudiar. El paso limitante en el logro de estos objetivos es la preparación de las muestras, ya que el número de proteínas solubilizadas en los geles depende en gran medida de la preparación de partida de las muestras. Por ello, el desarrollo de un protocolo adecuado de extracción es crucial para conseguir la completa solubilización, desnaturalización y reducción de las proteínas del tejido y, de esta forma, se procura que cada mancha en el gel corresponda a una sola especie proteica. Durante la optimización llevada a cabo durante este trabajo, se probaron distintas modificaciones en los protocolos de extracción tanto a nivel de los componentes del tampón de lisis como en las condiciones de incubación y centrifugado de los extractos proteicos, con el fin de mejorar la solubilización de proteínas y su separación de la fase lipídica. Asimismo, se optimizaron distintas condiciones de isoelectroenfoque en función de varios parámetros: rango de pH utilizado, composición de los tampones de hidratación y carga de las proteínas, modo de rehidratación de las tiras y las condiciones de voltaje necesarias para el correcto enfoque de las proteínas. Por último, también se probaron distintos métodos de tinción de los geles tras la electroforesis SDS-PAGE: tinción con azul de Coomassie y con nitrato de plata. Dada la gran variedad de condiciones probadas, en esta memoria, se van a describir únicamente aquellas que nos proporcionaron los mejores resultados para la obtención de geles de pH 3-10, 4-7 y 6-11.

Un problema muy frecuente que dificulta la obtención de geles 2DE reproducibles es la aparición de líneas horizontales de proteínas, tal como se puede apreciar en la figura 4.6A. Este hecho se origina principalmente por la agregación y precipitación de proteínas durante la etapa de isoelectroenfoque debido a la insuficiente solubilidad de algunas proteínas. En este sentido, hemos comprobado que el tipo de agente reductor utilizado en el tampón de hidratación influye en la resolución de las proteínas de tejido adiposo, pues tal como refleja la Figura 4.6, la sustitución de TCEP-HCl por DTT en geles de pH 4-7 disminuye la aparición de líneas horizontales y aumenta el número de proteínas correctamente solubilizadas.

En los rangos de pH básicos, se produce la pérdida de agente reductor en la región alcalina de las tiras IPG debido a que el DTT se carga negativamente a estos pH y migra hacia el ánodo, conduciendo a reoxidación de grupos tiol y, con ello, a la reducción de la solubilidad de las proteínas (Gorg *et al.*, 2000). Este efecto no se soluciona con el aumento de la concentración de DTT utilizada, tal como se puede comprobar en los geles 6-11 de la Figura 4.7A y B. Hemos comprobado que la sustitución de DTT por HED en estos geles (Figura 4.7C) disminuye la aparición de líneas horizontales y mejora en gran medida el

enfoque de las proteínas, lo que permite la obtención de un patrón de proteínas más simplificado, con mayor número de proteínas solubilizadas, aumentado con ello la reproducibilidad de los geles. El HED oxida los grupos tiol de las proteínas evitando permitiendo que las proteínas se mantengan como especies únicas sin que se produzcan reacciones no deseadas entre ellas (Corton *et al.*, 2004; Olsson *et al.*, 2002).

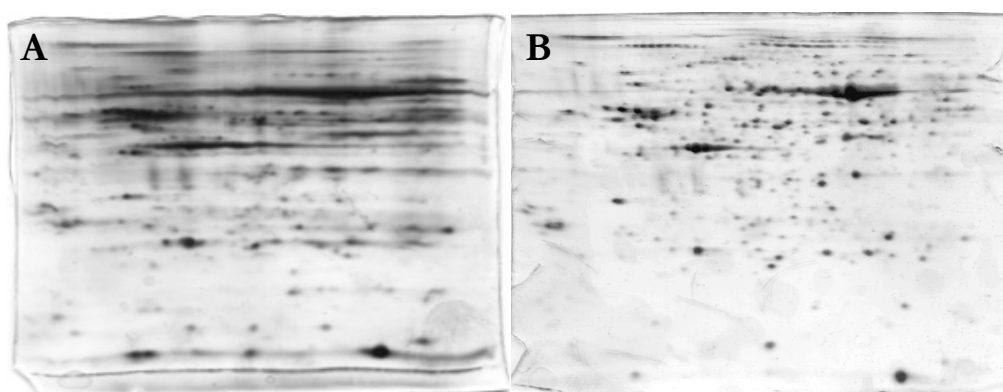


Figura 4.6. Mejora de la resolución de las proteínas con el empleo de DTT. Las proteínas (40 μ g) se extrajeron en 8.4 M Urea, 2.4 M Tiourea, 4% CHAPS, 2 mM TCEP-HCl y 1% tampón IPG pH 4-7. Los geles se realizaron empleando tiras IPG de 11 cm con rango de pH 4-7. El tampón de hidratación (8 M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS y 0.5% tampón IPG pH 4-7) se suplementó con 1mM TCEP-HCl (A) ó 50mM DTT (B). Las condiciones del isoelectroenfoque fueron 6h a 30 V, 6 h a 60 V; 1h a 120 V; 1h a 200 V; 1h a 500 V; 1h a 1000 V; un paso de gradiente de 1000 a 8000 V en 1.5 h; paso final a 8000 V hasta alcanzar un total de 14 kWh.

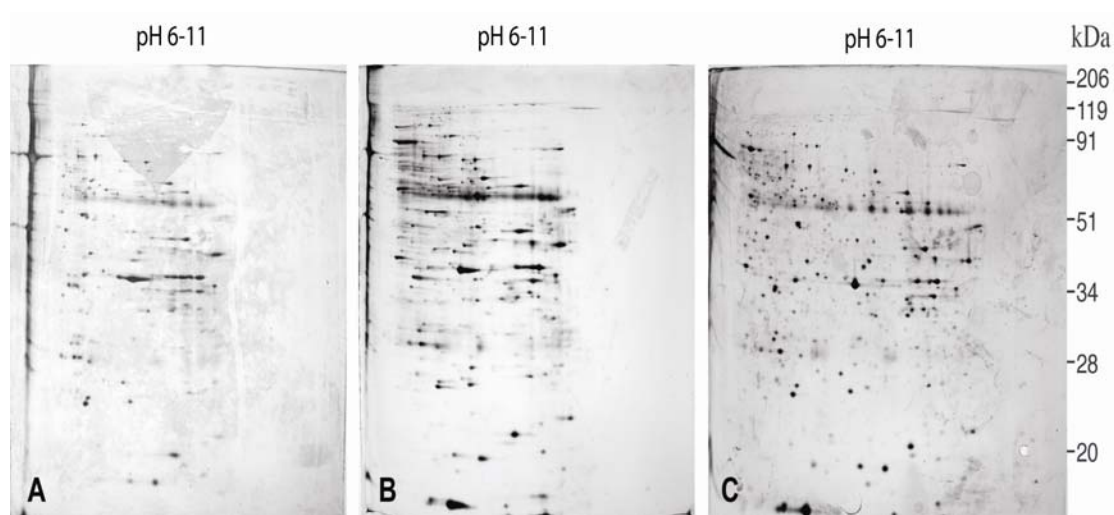


Figura 4.7. Perfil proteico del tejido adiposo omental utilizando tiras IPG de 18 cm en rango de pH 6-11. La hidratación se hizo en presencia de 10 mM DTT (A), 50 mM DTT (B) y 100 mM de HED (C). La muestra (80 μ g) se aplicó mediante el sistema *cup-loading* cerca del ánodo. Condiciones de isoelectroenfoque: 3h a 300V, gradiente de voltaje de 300 a 600V en 2 h, gradiente de 600 a 1000V en 2 h, de 1000 a 8000V en gradiente de 3 h y paso final a 8000V hasta alcanzar un total de 58 kWh.

Hemos podido comprobar que el empleo de HED también mejora el enfoque en geles de rango amplio de pH. Tal como se puede observar en la Figura 4.8 A y B, el aumento de la concentración de 10 a 50 mM de DTT en geles pH 3-10 mejora la resolución en las zonas ácidas (la zona izquierda del gel en las figuras), sin embargo en las zonas básicas se produce un efecto opuesto al buscado, aumentando la aparición de líneas horizontales y disminuyendo la definición de las manchas. Se puede apreciar en la tercera imagen de la figura (Figura 4.8C) que la sustitución de DTT por HED conduce a la desaparición de las líneas horizontales y, al mismo tiempo, al aumento de la resolución y del número de proteínas solubilizadas. Esta última observación ha podido ser verificada de forma cuantitativa utilizando el programa PD-Quest, con el que hemos podido comprobar que, de media, se han detectado 110 y 123 manchas adicionales con el uso de HED en lugar de 10 mM DTT ó 50mM DTT, respectivamente. Además, la mejora en la calidad de los geles se aprecia de forma cualitativa con la simple comparación visual de los tres tipos de geles, ya que la mayoría de las proteínas aparecen mejor definidas y con un menor diámetro en los geles donde se ha sustituido el DTT por HED.

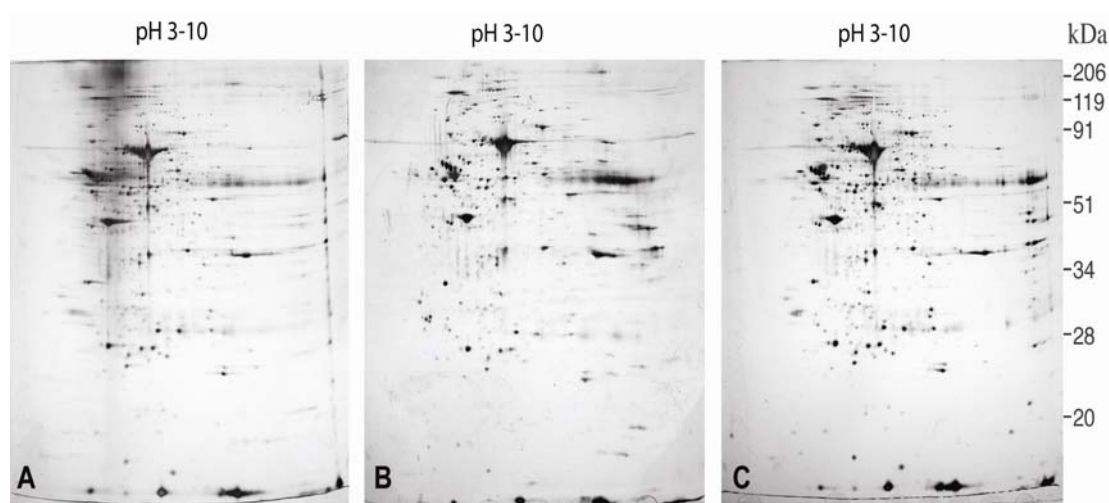


Figura 4.8. Perfil proteico del tejido adiposo omental utilizando tiras IPG de pH 3-10 y 18 cm. La hidratación se llevó a cabo en presencia de 10mM DTT (A), 50 mM DTT (B) y 100 mM de HED (C). Condiciones de isoelectroenfoque: 6h a 30 V, 6 h a 60 V; 1h a 120 V; 1h a 200 V; 1h a 500 V; 1h a 1000 V; un paso de gradiente de 1000 a 8000 V en 1.5 h; paso final a 8000 V hasta alcanzar un total de 35 kVh.

Una vez puesta a punto la obtención de mapas proteicos del tejido adiposo, hemos procedido a identificar proteínas en los mapas 2DE con el fin de contribuir a la caracterización del proteoma del tejido adiposo. Los puntos señalados en la Figura 4.9 fueron recortados de los geles y digeridos con tripsina porcina, los péptidos de digestión resultantes fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF. De las 62 manchas analizadas,

57 fueron identificadas como proteínas individuales (Tabla 4.10), lo que indica que las condiciones utilizadas tanto en la solubilización como posterior IEF permiten una óptima separación de las proteínas en los geles 2DE ya que se ha identificado una única especie proteica por mancha. Algunas de las proteínas han sido identificadas en varias manchas, reflejando la posible existencia de isoformas, modificaciones post-traduccionales o productos de degradación.

De todas las condiciones probadas durante la puesta a punto de la técnica, se decidió que el posterior análisis diferencial de la expresión proteica en el tejido adiposo de pacientes PCOS se debía llevar a cabo con aquellas que solubilizaran y resolvieran el mayor número de proteínas posible. El empleo de un rango amplio de pH, como el 3-10, permite obtener, en principio, una representación más completa del conjunto de proteínas de un tejido, sin embargo, una vez que se obtuvo el proteoma del tejido adiposo omental se pudo comprobar que no era el rango más interesante para realizar el estudio comparativo.

Como se puede observar en la Figura 4.9, aparentemente, en el tejido adiposo omental no existen muchas proteínas con pH extremos. En el rango de pH 3-10, además, se reflejan de forma más patente las diferencias existentes en la abundancia de proteínas en el tejido. La gran abundancia encontrada para algunas proteínas, entre ellas la albúmina sérica (manchas #1, #7, #11 y #12 en gel 3-10 de la Figura 4.9 y Tabla 4.10), Actina (mancha #2 en gel 3-10 de la Figura 4.9 y Tabla 4.10) y cadenas pesadas de inmunoglobulinas tipo γ (manchas #17, #18, #51 y #52 ó #61-#62 en los geles 6-11 y 3-10, respectivamente; Figura 4.9 y Tabla 4.10) dificultan que otras proteínas menos abundantes puedan solubilizarse y aparecer en el mapa 2DE. Por otro lado, la disminución del rango de pH utilizado permite la solubilización y resolución de un mayor número de proteínas, tal como se puede apreciar en la figura. Esto también se valoró de forma cuantitativa mediante el programa PD-Quest, pudiendo constatar que la combinación de los dos rangos estrechos, 4-7 y 6-11, permite la detección de un mayor número de proteínas que en el rango 3-10, en el que únicamente se resolvieron 600 manchas. Por tanto, estos resultados parecen indicar que la mayor proporción de proteínas del tejido adiposo omental presentan *pI* entre 4-7 (Figura 4.9). Por todas las razones aquí expuestas, se decidió emplear el rango de pH 4-7 en los posteriores análisis de proteómica comparativa, en detrimento del uso de geles de rango más amplio. La escasez en la cantidad de muestra disponible nos impidió que también analizáramos el rango de pH 6-11 en este estudio.

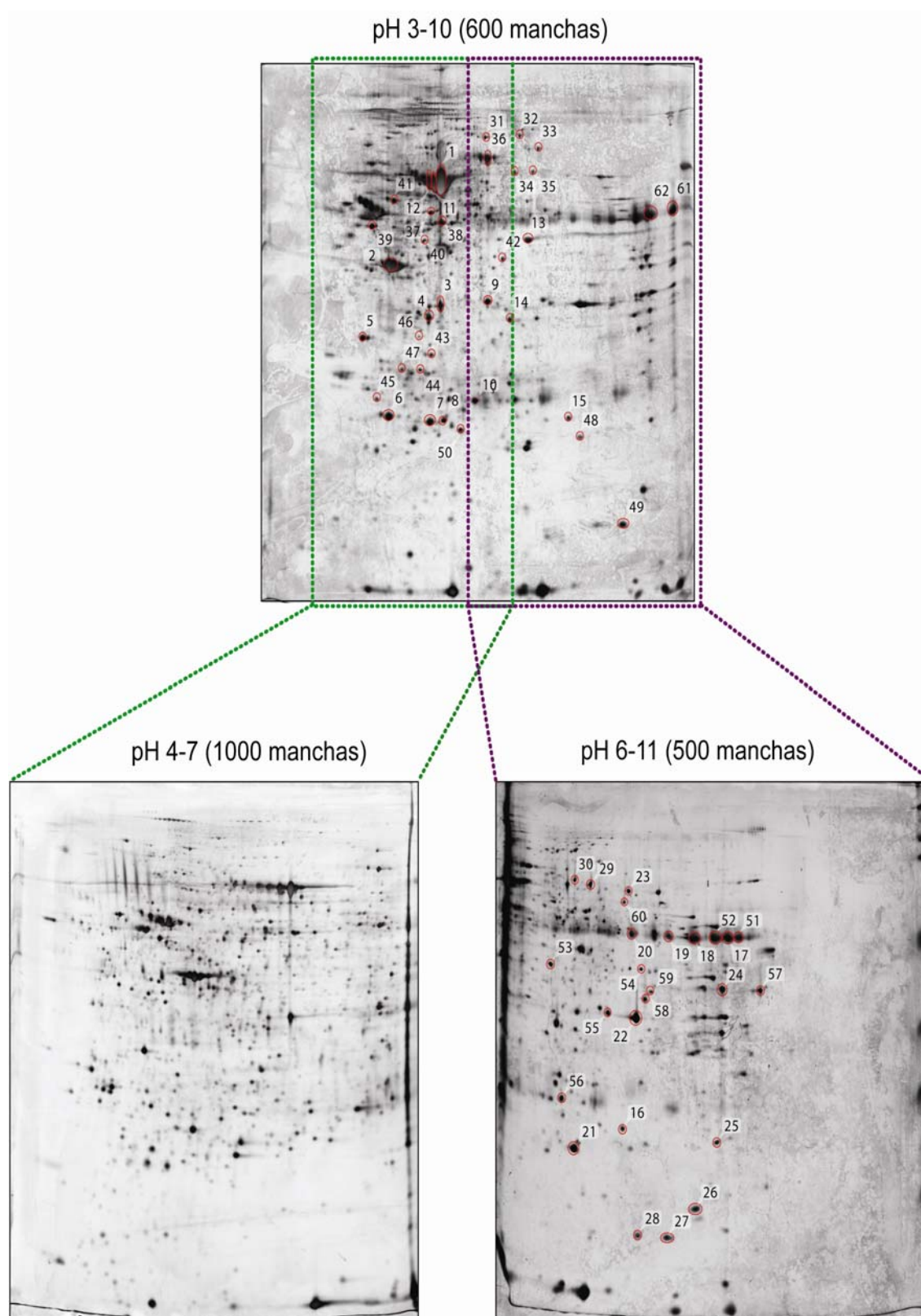


Figura 4.9. Mapas 2DE que representan el proteoma del tejido adiposo omental procedente de pacientes obesas. Se utilizaron tiras IPG de 18 cm de tres gradientes de pH distintos. En el gel superior, se muestra el perfil proteico obtenido con 80 μ g de proteína en el rango amplio de pH 3-10. Se indica el solapamiento de dicho gel con los geles inferiores realizados con rangos más estrechos de pH y 100 μ g de proteína. Las líneas de color verde indican los límites de pH 4-7 y en color morado el límite para el pH 6. Los puntos señalados se recortaron y se digirieron para la identificación de las proteínas por espectrometría de masas y mapeo peptídico (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Proteínas del tejido adiposo omental identificadas mediante MS-MALDI-TOF.

Mancha ^a	Identidad de la proteína	Nº de Acceso ^b	Mr/pI ^c	Mascot ^d	Gel ^e
1	Human Serum Albumin	gi 4389275	68/5.7	193	3-10
2	Actin, gamma 1 propeptide	gi 4501887	42/5.3	74	3-10
3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	gi 21594877	38/5.8	157	3-10
4	Lactate dehydrogenase B	gi 4557032	37/5.7	171	3-10
5	Annexin V	gi 17391477	36/4.9	180	3-10
6	Propapolipoprotein A1	gi 4557321	31/5.5	184	3-10
7	Human Serum Albumin	gi 4389275	68/5.7	122	3-10
8	Perilipin	gi 4505885	56/6.8	144	3-10
9	Annexin I	gi 4502101	39/7.6	162	3-10
10	Peroxiredoxin 6	gi 4758638	25/6	152	3-10
11-12	Human Serum Albumin	gi 4389275	68/5.7	357	3-10
13	Enolase 1	gi 4503571	47/7	93	3-10
14	Cytosolic malate dehydrogenase	gi 5174539	36/6.9	123	3-10
15	Biliverdin-IX beta reductase isozyme I	gi 544759	22/7.3	73	3-10
16	Biliverdin-IX beta reductase isozyme I	gi 544759	22/7.3	73	6-11
17-18	Immunoglobulin heavy chain gamma	gi 2765425	53/8.7	74	6-11
19	Doublecortin-like kinase	gi 4758128	82/8.8	63	6-11
20	Nebulin-related anchoring protein isoform C	gi 29887969	19/9.3	66	6-11
21	Crystallin, alpha B	gi 4503057	20/6.8	120	6-11
22	Annexin A2	gi 16306978	39/7.6	178	6-11
23	Transketolase	gi 4507521	68/7.6	81	6-11
24	Aldolase A	gi 229674	40/8.4	84	6-11
25	Peroxiredoxin 1	gi 4505591	22/8.3	113	6-11
26	Cofilin 1	gi 5031635	19/8.2	67	6-11
27-28	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	gi 10863927	18/7.7	89	6-11
29	Complement component 3 precursor	gi 4557385	19/6	131	6-11
30	Long-chain fatty-acid-Coenzyme A ligase 2	gi 11276083	79/6.8	119	6-11
32	Eukariotic translation elongation factor 2	gi 4503483	96/6.4	66	3-10
33	Aconitase 2	gi 5304852	85/7.2	137	3-10
34-35	Complement component 3 precursor	gi 4557385	19/6	95	3-10
36	Transferrin	gi 4557871	79/6.8	291	3-10
37	ER-60 protein	gi 2245365	57/5.9	221	3-10
38	Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase	gi 6137677	54/5.7	112	3-10
39	ATP synthase beta subunit	gi 1374715	51/4.9	215	3-10
40	ARP3 actin-related protein 3	gi 5031573	48/5.6	111	3-10
41	Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin)	gi 31542947	61/5.7	155	3-10
42	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	gi 3641398	47/6.3	93	6-11
43	EH-domain containing 2	gi 21361462	61/6	89	3-10
44	Proteasome activator complex subunit 1	gi 18202272	29/6	88	3-10
45	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	gi 10835002	23/5.1	66	3-10
46	Annexin A3	gi 4826643	36/5.6	99	3-10
47	Proteasome activator complex subunit 2	gi 18203506	27/5.4	112	3-10
48	Neuropolypeptide h3	gi 4261934	16/8.8	68	3-10
49	Cofilin 1	gi 5031635	19/8.2	82	3-10
51-52	Immunoglobulin heavy chain gamma	gi 2765425	53/8.7	73	6-11
53	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	gi 3641398	47/6.3	93	6-11
54	Citrate synthase precursor	gi 4758076	52/8.1	64	6-11
56	Triosephosphate Isomerase, Chain A	gi 999892	27/6.5	121	6-11
57	Alcohol Dehydrogenase, Chain A	gi 494091	40/8.5	86	6-11
60	Monoamine oxidase A	gi 4557735	60/7.9	80	6-11
61-62	Immunoglobulin heavy chain gamma	gi 2765425	53/8.7	87	3-10

^a El número de mancha se correlaciona con la numeración seguida en la Figura 4.9. ^b Número de acceso para la base de datos proteica del NCBI. ^c Valores teóricos de peso molecular en kDa y pI. ^d Valor obtenido en la identificación de la proteína con el programa Mascot. ^e Gel del que se extrajo la mancha para ser posteriormente identificada.

4.4.2. Estudio de la expresión diferencial de proteínas en PCOS.

Los protocolos optimizados para la obtención de mapas 2DE del tejido adiposo omental fueron aplicados al estudio de la expresión diferencial de proteínas en pacientes con PCOS y mujeres control siguiendo el diseño experimental detallado en la Figura 4.10. El objeto de este estudio fue comprobar si alteraciones en la función adiposa en el PCOS se reflejaban en cambios en la expresión proteica, de la misma manera que hemos visto que ocurre a nivel de expresión génica.

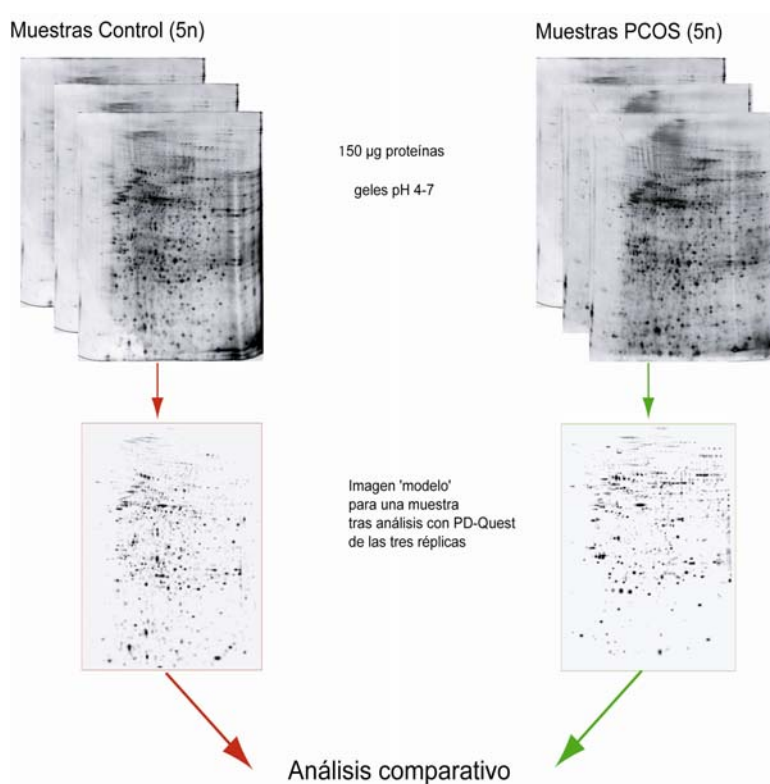


Figura 4.10. Esquema del diseño experimental utilizado en el análisis de la expresión diferencial de proteínas en el tejido adiposo omental de PCOS y controles. Se utilizaron tiras IPG de 18 cm y rango de pH 4-7. Condiciones de IEF: 6h a 30 V, 6 h a 60 V; 1h a 120 V; 1h a 200 V; 1h a 500 V; 1h a 1000 V; un paso de gradiente de 1000 a 8000 V en 1.5 h; paso final a 8000 V hasta alcanzar un total de 40 kVh. Cada triplicado se analizó independientemente con el programa PD-Quest para obtener una imagen “modelo” del perfil proteómico de cada individuo, reflejo de las proteínas que están presentes en las tres réplicas. Posteriormente, se obtuvo una imagen “modelo” para el fenotipo PCOS y otra para el fenotipo control, las cuales fueron comparadas para determinar diferencias en la presencia/ausencia de proteínas.

Se obtuvo el perfil proteico de 5 pacientes con PCOS para compararlo con 5 mujeres control mediante geles 2DE teñidos con plata. Las muestras se seleccionaron a partir de la población de mujeres con obesidad mórbida en función de los requerimientos de homogeneidad descritos anteriormente. Se realizaron geles por triplicado de cada una de las muestras, por tanto, se analizaron 15 geles para cada fenotipo. Se diluyeron 150 µg de extracto proteico en 350 µl de solución de hidratación con 50 mM DTT y tampón IPG pH 4-7 al 0.5%. La carga de las muestras en las tiras se realizó por el método de rehidratación en

gel. Los geles se fijaron toda la noche y se tiñeron con plata. Se utilizó el programa PD-Quest para analizar la reproducibilidad de la técnica a partir de los triplicados realizados por muestra y posteriormente, para comparar los perfiles de proteínas obtenidos para cada fenotipo (Figura 4.10).

De media, se obtuvieron unas 1500 manchas bien resueltas por gel en un rango de 12-110 kDa, encontrándose unas 1100 manchas en común en los triplicados de cada muestra, con un CV (coeficiente de variación) alrededor del 40%. Esta alta variabilidad obviamente no sólo afectaba a triplicados de la misma muestra sino de forma más patente a muestras dentro del mismo fenotipo. Este hecho dificultó en gran medida la tarea de comparación hasta el punto de que no fue posible encontrar cambios cualitativos (aparición/desaparición) lo suficientemente consistentes entre los dos grupos de individuos. La variación observada entre los geles de los dos grupos a comparar es el reflejo de la combinación de la varianza genética existente entre las muestras y de la variación técnica, lo que dificulta la comparación y enmascara los posibles cambios de expresión. Asimismo, se analizaron los cambios cuantitativos en la intensidad de las manchas con la finalidad de detectar cambios de expresión entre los dos grupos de muestras sin que se obtuviesen resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Este resultado, más que indicar la ausencia de diferencias en la expresión proteica en el tejido adiposo de los pacientes con PCOS *vs* controles, es un reflejo de la variabilidad técnica o muestral. Asimismo, en nuestro afán de evitar falsos positivos y de analizar solo aquellas manchas con patrón totalmente reproducible entre réplicas (presentes en los 3 replicados) y entre muestras (presentes en al menos 4 de las 5 muestras), algunas proteínas con diferencias de expresión han podido ser descartadas para los análisis posteriores. Todo ello contribuye a que los posibles cambios de expresión se hayan mantenido enmascarados dentro de la variabilidad del sistema. Esta técnica presenta varias limitaciones a la hora de realizar el análisis comparativo de las imágenes, siendo las más importantes la baja reproducibilidad gel a gel (CV > 20%) y la falta de linealidad de la tinción de plata utilizada, lo que dificulta la correcta cuantificación de la intensidad de las manchas.

Para poder discriminar los cambios biológicos de la variación técnica asociada al método de geles 2DE, se empleó el sistema de 2DE-DIGE de forma alternativa a la tinción con plata. Esta técnica se basa en el marcaje diferencial de las muestras con distintos fluorocromos, lo que permite discriminar las especies proteicas con cambios de expresión de una manera más eficiente, gracias a la comparación directa de la intensidad de fluorescencia emitida por cada fluorocromo. Otra diferencia metodológica de esta técnica es que cada gel 2DE se realiza con dos de las muestras a comparar, junto con un patrón interno formado por

la mezcla equimolecular de todas las muestras a analizar. Entonces, cada especie proteica presente en cada una de las muestras estará representada en todos los geles; de esta manera las señales de fluorescencia podrán ser normalizadas tomando como referencia dicho patrón interno (Alban *et al.*, 2003) (ver Figura 4.11). Por ello, este diseño permite solventar los problemas de reproducibilidad de las técnicas “clásicas” de 2DE.

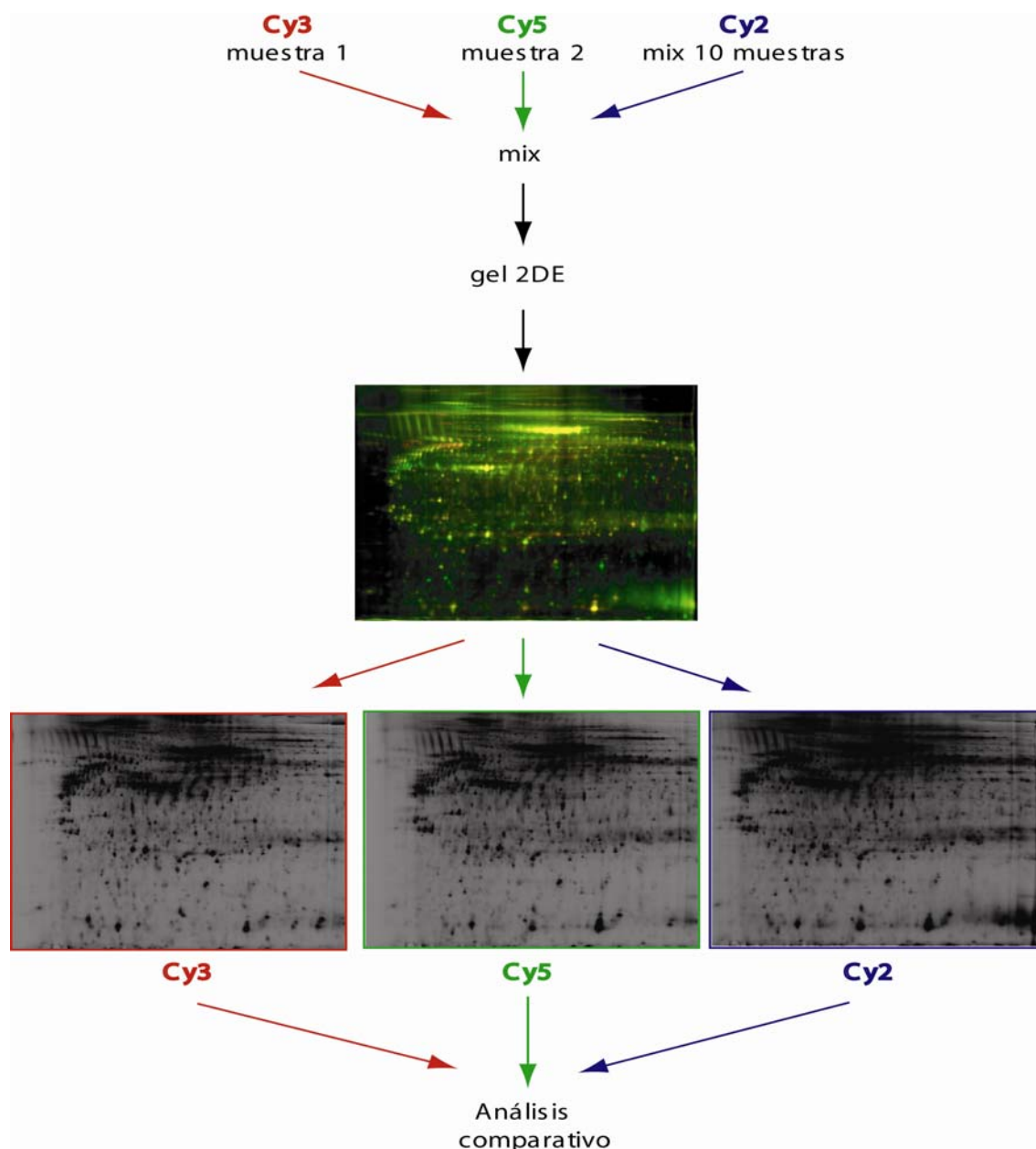


Figura 4.11. Esquema del análisis de expresión diferencial en el tejido adiposo omental mediante la técnica 2DE-DIGE. Los extractos proteicos de los dos grupos de muestras a comparar se marcan de forma diferencial con dos fluoróforos, Cy3 ó Cy5, y el patrón interno con Cy2. Los tres tipos de muestras marcadas se analizaron en un mismo gel 2DE utilizando tiras IPG de 24 cm y pH 4-7 en el paso de IEF y 12% de acrilamida en la separación por SDS-PAGE. En la parte superior, se muestra la imagen superpuesta con las intensidades de fluorescencia obtenidas para los tres fluoróforos. En la parte inferior, las imágenes obtenidas para cada uno de los canales de fluorescencia se muestran por separado.

En el análisis de expresión diferencial de proteínas de tejido adiposo en pacientes PCOS y controles mediante 2DE-DIGE se compararon un total de cinco geles, lo que implica el análisis de 10 muestras en total. Para evitar sesgos debido a un posible mayor marcaje con uno de los fluorocromos, tres muestras PCOS y dos muestras control se marcaron con Cy3, y las muestras restantes con Cy5. El patrón interno con la mezcla equimolecular de las 10 muestras a analizar se marcó con Cy2. Los tres tipos de muestras diferencialmente marcadas (Cy3, Cy5 y Cy2) se analizaron en un mismo gel. De cada uno de los geles, se obtuvieron 3 imágenes de fluorescencia, una para cada fenotipo y otra correspondiente al patrón interno, tal como se muestra en la Figura 4.11.

Las imágenes se importaron al programa DeCyder para detectar proteínas diferencialmente expresadas. La imagen de Cy2, como referencia interna, se utiliza en los procesos de normalización, sustracción del ruido de fondo y comparación automática de los geles, lo que aumenta la calidad y reproducibilidad del análisis de los entre los distintos geles. En el análisis de estas imágenes se detectó una media de 4750 manchas/gel. La cuantificación de los cambios de expresión se realizó en modo automático teniéndose en cuenta únicamente 1848 manchas, tras realizar un filtrado de aquellas que no hubieran sido detectadas en al menos 4/5 geles. Con el fin de discriminar las proteínas reales de posibles artefactos se excluyeron también aquellas manchas que presentaran un volumen menor a 150,000 y una pendiente mayor a 1.6. Este análisis permitió detectar 17 manchas con diferencias significativas ($p < 0.05$) en su expresión de al menos dos veces (Tabla 4.12), no detectándose en ningún caso aparición/desaparición de manchas. Doce de las manchas diferenciales disminuían su expresión en el tejido adiposo de pacientes PCOS y cinco presentaban sobreexpresión. La posición de las manchas con expresión diferencial entre los dos grupos de individuos se muestra en la Figura 4.12, y el ejemplo de una de dichas manchas se muestra en la Figura 4.13, bajo la representación modelo en 3D proporcionada por el programa de análisis.

Las manchas con cambios significativos de expresión en el anterior análisis fueron analizadas por MALDI-TOF MS. La identificación de las proteínas se realizó mediante mapeo peptídico utilizando el programa Mascot como herramienta de búsqueda en la base NCBI nr, identificándose once de las manchas con expresión diferencial, todas ellas como únicas especies proteicas presentes en la mezcla de digestión, excepto en el caso de la mancha #4 donde se ha encontrado una mezcla peptídica para dos proteínas distintas (Tabla 4.12). Un ejemplo de los espectros MS utilizados en la identificación de las proteínas se muestra en la Figura 4.14. En el caso de dos manchas, la identificación de la proteína fue confirmada

mediante análisis de fragmentación MS/MS de uno de los péptidos. Las seis manchas restantes no pudieron ser identificadas debido posiblemente a que la cantidad de proteína no era suficiente para llevar a cabo la identificación, a la existencia de mezclas peptídicas o a la falta de coincidencia del espectro de masas obtenido con los incluidos en las bases de datos utilizadas.

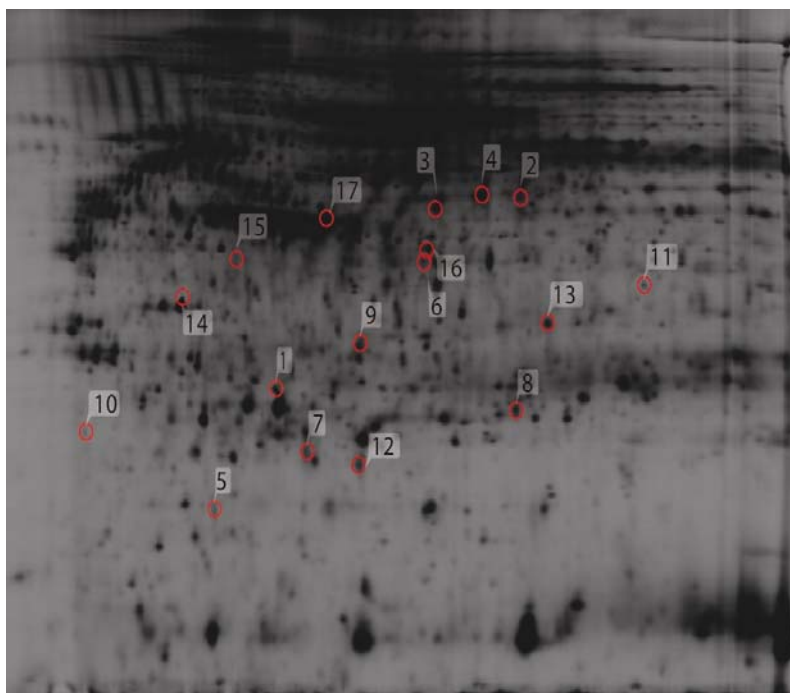


Figura 4.12. Imagen representativa del perfil proteómico del tejido adiposo omental obtenido en el análisis 2DE-DIGE. La imagen muestra el mapa correspondiente al patrón interno marcado con Cy2, el cual es común en todos los geles. Las manchas señaladas con un número muestran diferencias significativas de expresión en el tejido adiposo de pacientes con PCOS *vs* Controles (*p*-valor < 0.05). Todas ellas fueron recortadas de varios de los geles utilizados en el experimento, digeridas con tripsina y analizadas por MS.

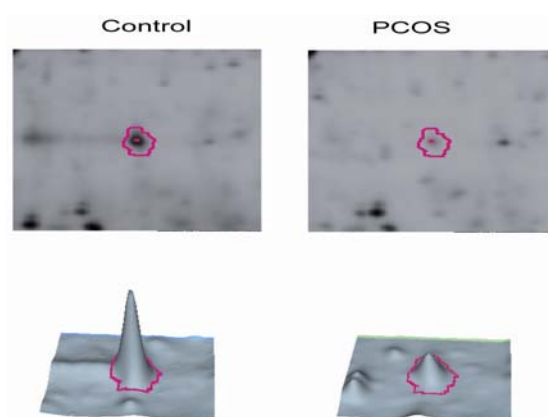


Figura 4.13. Representación de la expresión proteica en 3D. Se muestra la localización de la proteína # 8 en las imágenes de una muestra control y de una muestra con PCOS junto con la representación 3D del volumen normalizado del punto. Los niveles de expresión de esta proteína están disminuidos en la muestra con PCOS.

Tabla 4.11. Proteínas con cambios significativos de expresión en el tejido adiposo omental en pacientes PCOS vs controles obtenidos en el análisis 2DE-DIGE.

Nº mancha ^a	Ratio ^b	p-valor ^c	Identidad de la proteína	Nº de Acceso ^d	Mr/pI ^e	Mascot ^f	Cobertura ^g	Péptidos ^h	Función biológica
1	2.43	4.1 E-5	Glutathione S-transferase M3 (GSTM3 protein)	gi 14250650	27/5.4	177	37	9	Metabolismo glutation
2	-2.26	0.0025	ALB protein	gi 27692693	49/6	100	15	6	Transporte
3	-2.28	0.0048	N.I. ⁱ						
4	-2.56	0.0081	Adipocyte plasma membrane-associated protein (APMAP)	gi:24308201	48/5.8	359	38	17	Desconocida
			Similar to human albumin (P02768)	gi 763431	53/5.7		18	8	Transporte
5	-2.79	0.015	N.I.						
6	-2.09	0.02	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)	gi 1346343	66/7.5	90	17	7	Citoesqueleto
7	-2.13	0.025	Proapolipoprotein ApoA1	gi 178775	29/53	287	63	18	Transporte colesterol
8	-4.01	0.025	Triosephosphate isomerase (TIM) ⁱ	gi 17389815	26/6.51	194		6	Metabolismo glucosa
9	2.11	0.027	N.I.						
10	-16.69	0.032	N.I.						
11	3.22	0.034	N.I.						
12	-3.12	0.037	Peroxiredoxin 2 isoform b ^k	gi 33188452	16/6.2	170	38	5	Actividad antioxidante
13	-2.33	0.044	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)	gi 1346343	66/7.5	95	16	6	Citoesqueleto
14	2.71	0.046	Annexin V	gi 999937	36/4.7	131	26	10	Unión a fosfolípidos
15	9.07	0.046	N.I.						
16	-4.39	0.048	ALB protein	gi 27692693	49/6	119	21	8	Transporte
1942	-2.58	0.048	Actin, beta	gi 15277503	40/5.8	109	19	6	Citoesqueleto

El número de identificación de las manchas se corresponde con el indicado en la Figura 4.12. ^b Ratio medio de los valores logarítmicos de abundancia normalizados para pacientes PCOS vs. Controles. ^c Significancia estadística calculada mediante test de la T de Student. ^d Número de acceso para la base de datos del NCBI. ^e Peso molecular en kDa y pI teóricos. ^f Valor proporcionado por el programa Mascot. ^g Porcentaje de la secuencia proteica cubierta por los péptidos identificados. ^h Número de péptidos coincidentes con la secuencia proteica. ⁱ N.I. Mancha no identificada por MS. ^j Proteína confirmada por fragmentación MS/MS del péptido **KEGGLGPLNIPLADVTR** con un valor de MASCOT de 162. ^k Proteína confirmada por análisis MS/MS del péptido **DCGATWVVLGHSE** con un valor de MASCOT de 96.

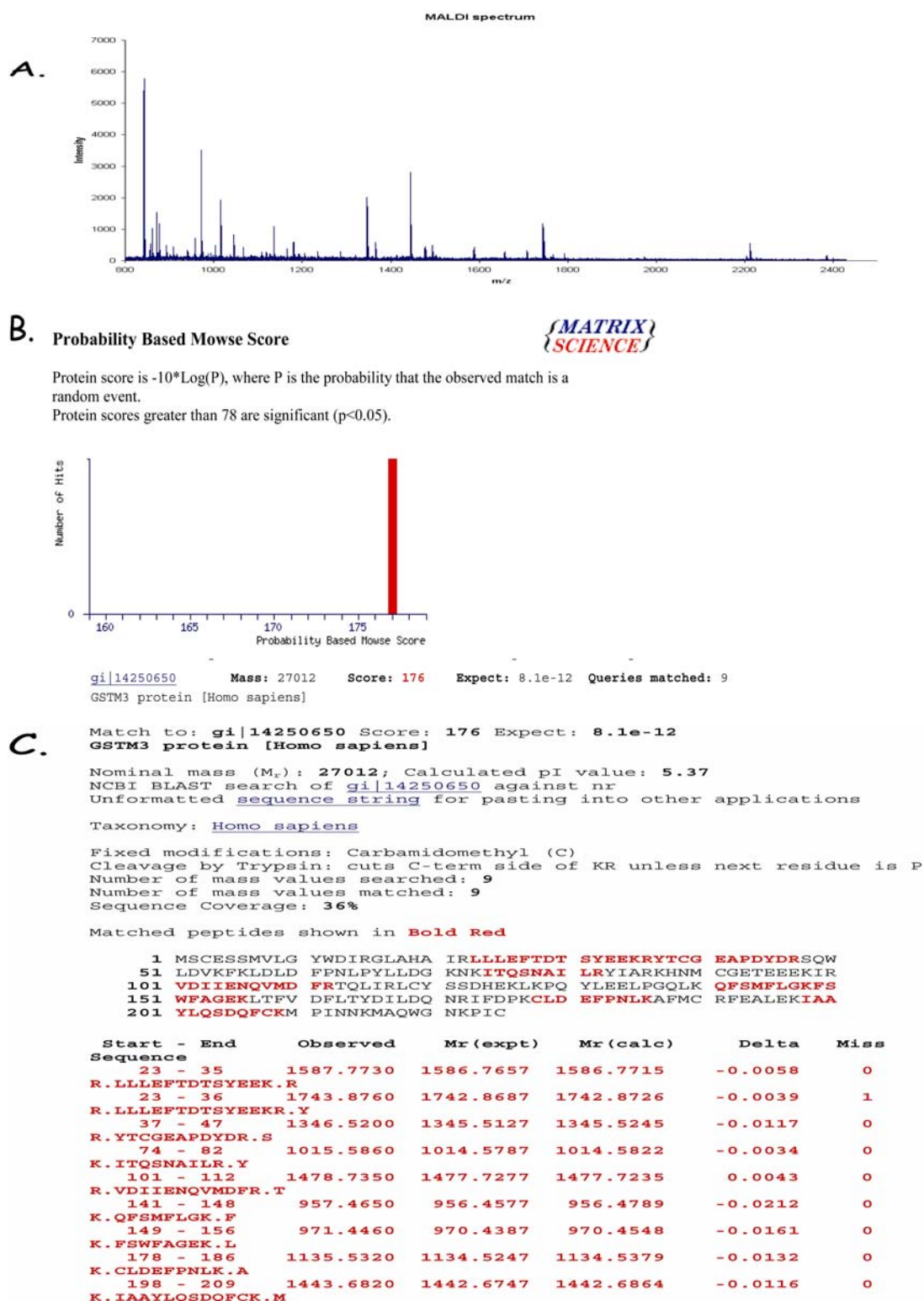


Figura 4.14. Análisis por espectrometría de masas de la proteína Glutathion S-transferasa de tipo M3. La mancha #1 (Figura 4.12) fue digerida con tripsina y los péptidos resultantes fueron analizados por MALDI-TOF/TOF. **A.** Espectro de masas obtenido en el análisis por MS. **B** y **C.** Identificación de la proteína por mapeo peptídico. Las nueve masas peptídicas obtenidas fueron identificadas como péptidos de la proteína GSTM3, cubriendo un 36% de la secuencia proteica (péptidos en rojo en Figura **B**). En esta búsqueda se utilizó la base de datos NCBI nr sin restringir por grupo taxonómico, tamaño o pI de las proteínas. Se consideró la tripsina como enzima de digestión, con un error máximo de corte de 1 y las cisteínas se consideraron carbamidometiladas. La proteína tiene una masa teórica de 27 kDa y un pI de 5.37.

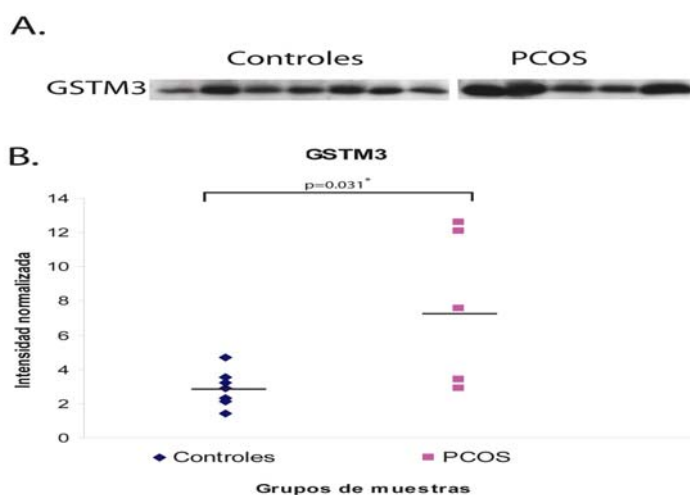
El cambio de aproximación en el análisis proteómico con geles 2DE nos ha permitido la detección de proteínas con cambios significativos de expresión en el tejido adiposo de las pacientes con PCOS. Por tanto, el uso de una referencia interna ha permitido discriminar cambios biológicos que no habían podido ser detectados durante la anterior comparación individual de los geles. Sin embargo, hay que asumir que la heterogeneidad del tejido y la variabilidad genética de los individuos pueden ser limitantes en este tipo de estudios. Así, sólo se han podido identificar un número pequeño de proteínas con expresión diferencial pero es muy posible que el número de falsos negativos sea alto dado el pequeño tamaño muestral empleado, por lo que es de esperar que el número de proteínas identificadas podría ser mayor si se aumentara el número de muestras en el análisis.

4.4.3. Validación de las diferencias de expresión por Western blot.

Del total de proteínas diferencialmente expresadas que han sido identificadas en el análisis 2DE-DIGE, hemos considerado interesante validar por una segunda técnica la expresión de la proteína *Glutation S-transferasa M3* (mancha #1, ratio = 2.43). La principal razón por la que esta proteína suscitó nuestro interés es que la expresión del gen GSTM3 aparece aumentada en el análisis de expresión génica diferencial realizado previamente. Además, presenta el mayor nivel de significancia estadística de todas las proteínas identificadas en el análisis por 2DE-DIGE ($p\text{-valor} = 4.1 \text{ E-}5$). Mediante *Western blot*, hemos analizado la expresión de esta proteína en 12 muestras de tejido adiposo utilizando un anticuerpo policlonal específico para GSTM3 (Figura 4.15A). Así, hemos verificado que la banda de proteína obtenida en la inmunodetección se corresponde con el peso molecular de la mancha correspondiente en el gel 2DE. En el análisis de la expresión detectada mediante *Western blot*, se observa que el ratio de expresión para GSTM3 está aumentado en las muestras PCOS en comparación con las muestras Control (ratio = 2.56; $p\text{-valor} = 0.031$; Figura 4.15B), lo que confirma las observaciones obtenidas previamente en el análisis de 2DE-DIGE.

Se conoce poco sobre la correlación entre la expresión génica y proteica, aunque en la mayoría de estudios donde se combinan métodos de *microarrays* y geles 2DE para el análisis de la expresión diferencial de ARNm y proteínas se ha visto que esta correlación suele ser pequeña. Cada gen puede dar lugar a varios transcritos distintos, que a su vez pueden ser traducidos a varias centenas de especies proteicas diferentes en función de las modificaciones post-traduccionales que sufren, de modo que es difícil valorar dicha correlación. A todo ello hay que añadir que existen dificultades técnicas para realizar la comparación global entre la expresión de genes y proteínas. Mientras que en la actualidad, se pueden analizar decenas de

miles de transcritos de forma simultánea en un *array* de DNA, a nivel proteómico la resolución es mucho menor, como máximo unos cientos o miles de proteínas pueden ser resueltas en un gel 2DE dependiendo del tamaño y del rango de pH de las tiras IPG empleadas. Además, hay que tener en consideración que los resultados obtenidos en un análisis 2DE pueden estar sesgados hacia las proteínas con mayor abundancia en el tejido a analizar, que son también las que más fácilmente pueden ser identificadas por espectrometría de masas. Una solución para solventar algunos de estos problemas sería el empleo de análisis proteómicos más sensibles y capaces de resolver un mayor número de proteínas, como por ejemplo, estrategias que combinan el prefraccionamiento de las muestras con el uso de distintos rangos de pH.



A pesar de las limitaciones descritas, el análisis proteómico nos ha permitido determinar que la desregulación de GSTM3 en el tejido adiposo omental de pacientes PCOS no ocurre únicamente a nivel de transcripción, observado por un aumento de casi 2 veces en su expresión génica en el análisis de *microarrays* y RT-*q*PCR, sino que se refleja también a nivel proteico. Estos estudios evidencian asimismo la desregulación de la expresión génica y proteica para distintas isoformas de actina.

Como existe la posibilidad de que algunos de los genes con expresión diferencial en el tejido adiposo de pacientes con PCOS no hayan podido ser discriminados en el estudio de 2DE-DIGE, hemos querido verificar la expresión proteica por *Western blot*. La selección de los genes a analizar se hizo en función de la disponibilidad de anticuerpos y de la validación previa por PCR cuantitativa. Los genes elegidos para este análisis fueron aquellos que

mostraron un aumento en su expresión de aproximadamente dos veces en el análisis por RT-*q*PCR. Tal como se observa en la Figura 4.16, excepto en el caso de NQO1, no se aprecian diferencias en la expresión en las proteínas analizadas. La proteína NQO1 muestra diferencias de expresión en las muestras de pacientes con PCOS en comparación con los controles, pero sin que se alcance un nivel de significación suficiente para considerar que difieren estadísticamente (ratio = 1.95; *p*-valor = 0.108).

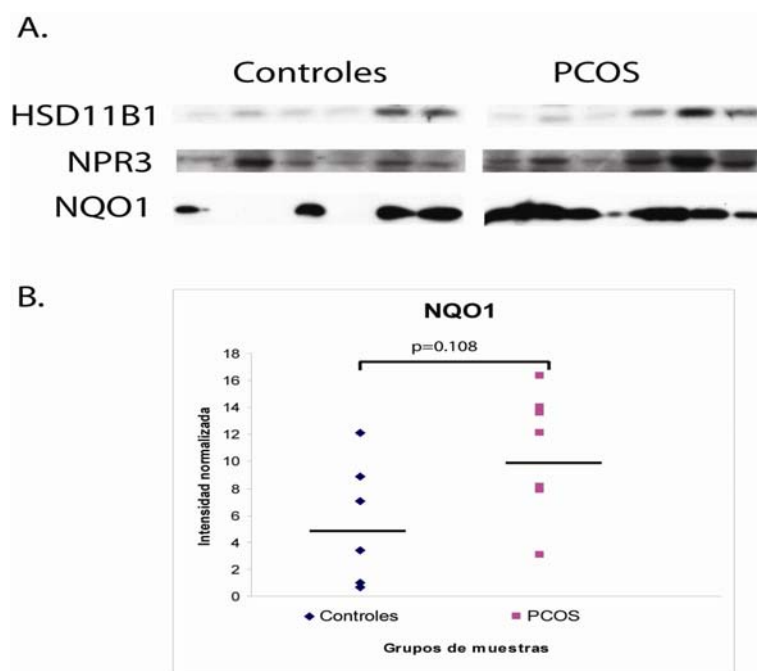


Figura 4.16. Expresión proteica de tres genes desregulados en el tejido adiposo omental de pacientes PCOS A. *Western blot.* Se realizaron geles de 1D-SDS-PAGE con extractos proteicos de tejido adiposo omental. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF e incubadas con anticuerpos específicos para la enzima 11- β -HSD-1, el receptor de péptidos natriuréticos de tipo C (NPR3) y la enzima NQO1. **B.** Las diferencias en la expresión de NQO1 fueron analizadas por un test de la T.

4.5. EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS ALTERADOS EN EL TEJIDO ADIPOSO OMENTAL EN EL PCOS.

La integración de los datos de expresión génica y proteica con anotaciones funcionales nos ha permitido destacar genes, proteínas, grupos funcionales y rutas de señalización que podrían estar alterados en el tejido adiposo de pacientes PCOS, incluyendo rutas de señalización de insulina, proteínas de estrés oxidativo, proteínas implicadas en la regulación del metabolismo lipídico, proteínas con función esteroideogénica, etc. En los siguientes apartados, se van a integrar las distintas evidencias que se pueden extraer del trabajo aquí presentado sobre la desregulación de rutas y procesos biológicos en el tejido adiposo en el PCOS.

4.5.1. Evidencias de alteraciones en la señalización de insulina.

Entre los genes con expresión alterada en el tejido adiposo con PCOS, destaca un grupo numeroso de genes implicados en la señalización de insulina en adipocitos (Figura 4.17), incluyendo ENPP1, PIK3R1, RHOQ, PKN2, EBF2 e isoformas de actina y miosina. Estos resultados están en concordancia con la observación *in vitro* de la inhibición en la captación de glucosa mediada por insulina en adipocitos de pacientes con PCOS (Ciaraldi *et al.*, 1997; Dunaif, 1997; Marsden *et al.*, 2001; Venkatesan *et al.*, 2001). Los defectos en la acción de la insulina en el PCOS son independientes de la obesidad, hecho que se confirma en nuestro trabajo con la observación de que las pacientes con PCOS presentan un mayor grado de resistencia a insulina en comparación con las mujeres control cotejadas por obesidad.

El origen de la insulinoresistencia de los adipocitos en el PCOS reside en un conjunto de alteraciones que tienen como último efecto la inhibición de la acción de la insulina (Corbould *et al.*, 2005; Dunaif *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2002). Entre otros, se han descrito defectos a nivel del receptor de insulina que conducen a la inhibición de la capacidad transductora de la subunidad β . En esta alteración puede estar contribuyendo el aumento de la expresión en el tejido adiposo omental del gen ENPP1, que codifica para PC-1, un inhibidor específico de la actividad tirosín-quinasa del receptor de insulina. Su unión a la subunidad α del receptor conduce a la inhibición de la actividad de la subunidad β (Maddux & Goldfine, 2000). Apoyando esta hipótesis, se ha descrito que el aumento en la expresión de ENPP1 en tejido adiposo y muscular se asocia en individuos no diabéticos con insulinoresistencia a una menor sensibilidad en la acción de la insulina (Frittitta *et al.*, 1996; Frittitta *et al.*, 1997). De forma similar, la sobreexpresión de ENPP1 en el tejido adiposo de pacientes con PCOS podría ser en parte responsable del desarrollo de insulinoresistencia en estas pacientes.

ENPP1 ha sido estudiado como gen candidato para el PCOS en estudios genéticos de asociación con resultados conflictivos. En un trabajo previo realizado por nuestro grupo, no se encontró asociación entre el polimorfismo K121Q del gen ENPP1 y el PCOS (San Millan *et al.*, 2004). Sin embargo, en otro trabajo más reciente se describe un aumento significativo de la frecuencia del alelo 121Q en pacientes con PCOS de origen finlandés (Heinonen *et al.*, 2004). El efecto del SNP K121Q parece estar modulado por otros dos polimorfismos del gen ENPP1, tal como se ha descrito en obesidad y DMT2 (Meyre *et al.*, 2005), hecho que podría explicar estas discrepancias.

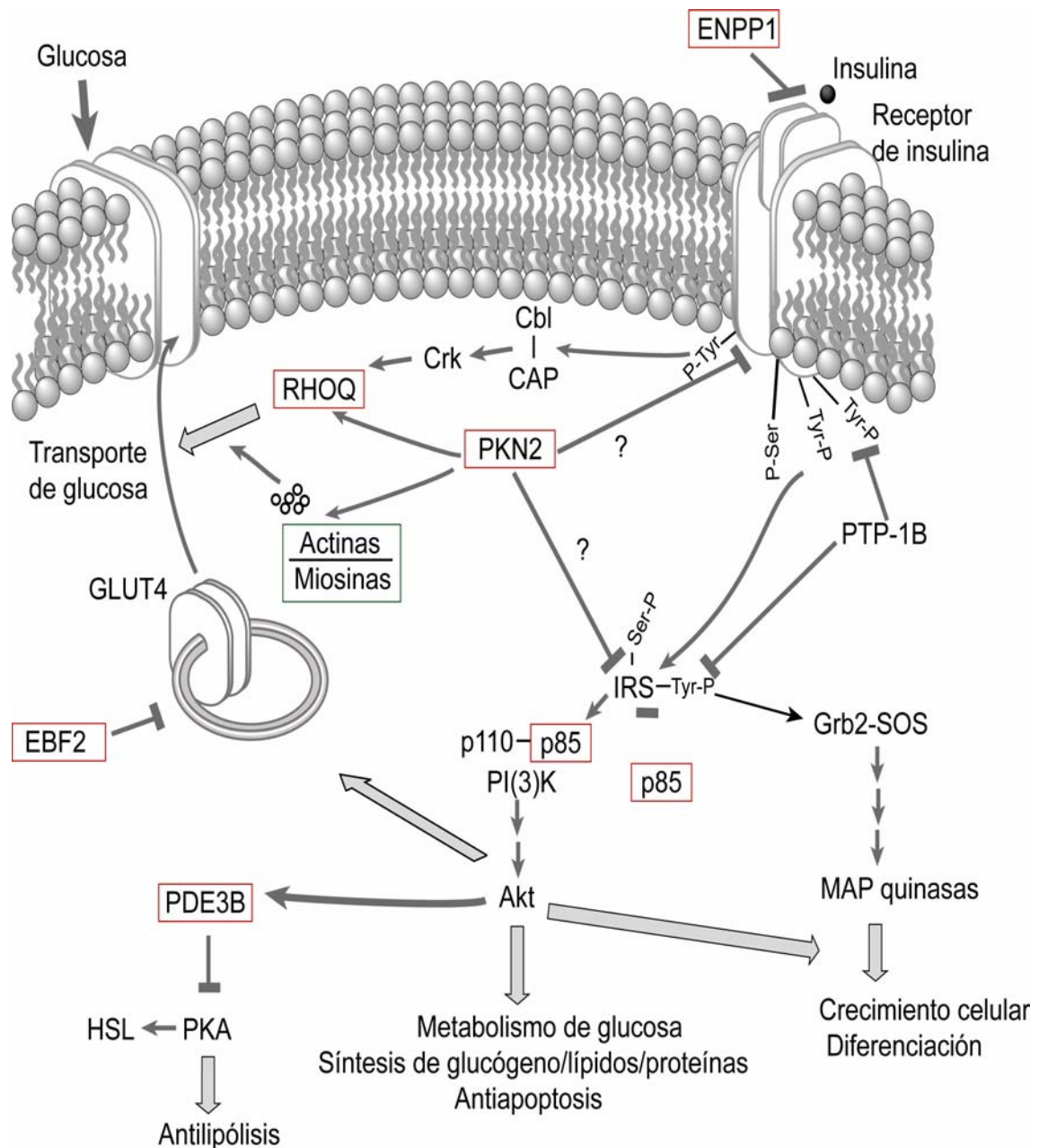


Figura 4.17. Genes con expresión alterada en el tejido adiposo omental de pacientes con PCOS implicados en la ruta de señalización de insulina. En rojo, aparecen los genes con expresión aumentada y en verde, los reprimidos.

Alteraciones coordinadas en la expresión de los genes implicados en las rutas de transducción de la insulina podrían conducir conjuntamente a la disminución global de la sensibilidad a la insulina observada en mujeres con PCOS. Así, PIK3R1 y RHOQ, genes que codifican la subunidad reguladora p85 α del complejo PI3K y TC10, respectivamente, presentan un aumento significativo de expresión en el tejido adiposo omental de pacientes con PCOS.

Se ha descrito que, de forma independiente a su papel regulador, las subunidades p85 de PI3K ejercen efectos negativos sobre la acción de la insulina. Así, los ratones PIK3R1-/- presentan un aumento de la sensibilidad a la insulina y del transporte de glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético (Terauchi *et al.*, 1999). En condiciones normales, el 30% de las moléculas p85 se encuentran en forma monomérica debido a su mayor abundancia con respecto a las subunidades catalíticas de PI3K (p110) y el balance entre moléculas p85/p110 determina la óptima transducción de la señal de insulina (Ueki *et al.*, 2002). Los monómeros de p85 inhiben la transducción por entrar en competencia con los heterodímeros p85-p110 por la unión a IRS fosforilado (Ueki *et al.*, 2003), y además por la formación de complejos que secuestran a IRS-1 (Luo *et al.*, 2005). Por tanto, pequeñas variaciones en el balance p85/p110 afectan en gran medida a la señalización dependiente de PI3K y parecen estar implicadas en el desarrollo de resistencia a insulina. Apoyando esta hipótesis, se ha visto recientemente que el aumento en p85 α , sin cambios en la expresión de p110, reduce la sensibilidad a insulina en pacientes insulinoresistentes (Bandyopadhyay *et al.*, 2005). Dado que en nuestro trabajo hemos observado un efecto similar, el aumento de expresión de PIK3R1 podría contribuir al aumento de la resistencia a insulina en el PCOS.

La remodelación del citoesqueleto de actina mediada por insulina es esencial en la regulación del tráfico de vesículas de GLUT4 a la membrana plasmática de los adipocitos (Kanzaki & Pessin, 2001). Varios de los genes desregulados en este estudio intervienen en la regulación de este proceso y, por ello, pueden estar contribuyendo en el estado de resistencia a insulina en el PCOS. Entre ellos, RHOQ codifica una GTPasa de la familia Rho (TC10) que media la regulación del citoesqueleto de actina de forma dependiente de insulina (Saltiel & Pessin, 2003). Un aumento en la expresión de TC10 provoca la disrupción de la actina cortical en adipocitos 3T3L1 e inhibe la translocación de GLUT4 (Kanzaki *et al.*, 2002). Se ha descrito que TC10 puede presentar funciones reguladoras positivas y negativas que modularían el balance de polimerización y despolimerización de la actina. Probablemente, la sobreexpresión de TC10 conduce a un predominio de la función inhibitoria lo que podría enmascarar la activación de la señal de insulina (Chunqiu Hou & Pessin, 2003).

PKN2, otro gen con expresión aumentada en las pacientes con PCOS, también está implicado en la reorganización del citoesqueleto. Codifica una proteína Ser/Treo quinasa que participa en la organización de los filamentos de actina junto con GTPasas de la familia Rho/Rac (Vincent & Settleman, 1997). Se podría especular sobre la posible implicación de esta enzima en la fosforilación de residuos serina en el receptor de insulina y en proteínas IRS, mecanismo previamente propuesto para explicar la inhibición de la acción de la insulina

en el PCOS (Corbould *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Es preciso tomar esta hipótesis con cautela dado que el aumento en la expresión de PKN2 no ha sido confirmado por RT-*q*PCR. Sin embargo, hay que añadir que esta falta de validación podría deberse a diferencias en el diseño de las sondas empleadas en el análisis de *microarrays* y PCR cuantitativa. Por otro lado, sería necesario realizar estudios funcionales *in vitro* encaminados a confirmar si PKN2 es capaz de fosforilar al receptor de insulina o a proteínas IRS en adipocitos.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que RHOQ y PKN2 presentan un patrón similar de expresión en el tejido adiposo (grupo F en Figura 4.2), lo que podría indicar una posible relación funcional entre estos dos genes. Ambos presentan posibles elementos de regulación para el factor de transcripción HNF-4, relacionado con la patología de la diabetes de tipo 2 (Love-Gregory *et al.*, 2004); estos indicios nos hacen pensar en una posible cooperación entre PKN2 y RHOQ en la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por insulina.

En el mismo grupo de genes coexpresados, en los que se incluyen PKN2 y RHOQ, aparece el gen EBF2 (*Early B-Cell Factor 2*), con aumento de expresión en el tejido adiposo de las pacientes con PCOS, tal como refleja el análisis por *microarrays* y RT-*q*PCR. Este gen pertenece a la familia de factores de transcripción Olf/EBF que han sido implicados en la regulación de la adipogénesis (Akerblad *et al.*, 2002) y en la represión transcripcional directa del gen GLUT4 en respuesta a insulina (Dowell & Cooke, 2002). Se ha descrito que en el PCOS se produce una disminución en el contenido de moléculas de GLUT4 en adipocitos de origen abdominal (Rosenbaum *et al.*, 1993). Estas evidencias hacen pensar que el gen EBF2 puede jugar un papel en el desarrollo de insulinoresistencia en el PCOS.

Distintos componentes del citoesqueleto que intervienen en la captación de glucosa mediada por insulina, han sido implicados en mecanismos de insulinoresistencia (Watson *et al.*, 2004). En este sentido, la inhibición de los genes ACTG2, ACTA2 y MYH11, que codifican distintas isoformas de actina y miosina, podría estar relacionada con la disminución en la sensibilidad a la insulina en el PCOS. Tal como se observa en la figura 4.2, estos genes no sólo comparten el mismo patrón de expresión sino que presentan posibles elementos comunes de unión para el factor de transcripción FOXA2. Este factor es un activador transcripcional de genes implicados en la señalización de insulina, tales como el receptor de insulina, IRS2 y GLUT4 y, a su vez, su actividad está regulada de forma negativa por insulina (Wolfrum *et al.*, 2003). En este sentido, se ha observado que la hiperinsulinemia crónica conduce a la inactivación de FOXA2 en síndromes de resistencia a insulina (Wolfrum *et al.*,

2004). Se podría pensar que la represión génica de proteínas de citoesqueleto es un reflejo de la inhibición de la actividad transcripcional de FOXA2 en los pacientes con PCOS como consecuencia de la insulinoresistencia.

La inhibición en la captación de glucosa en el tejido adiposo podría conducir asimismo a la desregulación de enzimas implicadas en su metabolismo. En este sentido, hemos podido determinar mediante el análisis proteómico que la expresión de la enzima glicolítica triosafosfato isomerasa (TIM) se encuentra reprimida 4 veces en los pacientes con PCOS con respecto a los controles.

En conjunto, nuestros resultados evidencian la existencia de desregulaciones génicas y proteicas en el tejido adiposo omental en el PCOS que conducirían a la disrupción en la captación de glucosa mediada por insulina y, en definitiva, a un estado de insulinoresistencia, consecuencias descritas previamente en adipocitos de pacientes con PCOS.

4.5.2. Evidencias de alteraciones en procesos de estrés oxidativo.

Entre los genes desregulados en el tejido adiposo de las pacientes PCOS, destacan genes implicados en procesos de estrés oxidativo y de detoxificación de productos oxidados. El estrés oxidativo es el resultado de un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su inactivación por sistemas antioxidantes de defensa. Numerosas evidencias indican que la hiperglicemia y el aumento en los niveles de ácidos grasos libres conducen a la sobreproducción de ROS (Brownlee, 2001; Evans *et al.*, 2002). Este aumento produce daños celulares y tisulares, manifestados por peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño del ADN, junto con cambios en la señalización de rutas de estrés, lo que en conjunto conduce a inflamación crónica y resistencia a insulina (Evans *et al.*, 2002). Por tanto, el estrés oxidativo parece tener un importante papel en el desarrollo de la patología asociada a los estados de insulinoresistencia y diabetes.

Se ha descrito recientemente que las mujeres con PCOS, en comparación con mujeres control, presentan un aumento en los niveles de distintos marcadores de estrés oxidativo, hecho que refleja un mayor estado oxidativo y una posible desregulación de los mecanismos compensatorios ejercidos por enzimas antioxidantes (Gonzalez *et al.*, 2006b; Sabuncu *et al.*, 2001; Yilmaz *et al.*, 2005b). El aumento del estrés oxidativo en PCOS es independiente de la obesidad y contribuye a un estado proinflamatorio que aumenta la insulinoresistencia y el hiperandrogenismo (Gonzalez *et al.*, 2005). En concordancia con estas observaciones, nuestros resultados muestran que en el tejido adiposo omental de pacientes con PCOS

existen cambios significativos en la expresión génica o proteica de enzimas con funciones protectoras frente a especies ROS como la enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), las enzimas Glutation S-transferasas de tipo M (GSTMs), la enzima aldehído deshidrogenasa ALDH1A3, las enzimas aldo-keto reductasas (AKRs) y la peroxirredoxina 2; y otras con un efecto opuesto, como la enzima tioéter oxidasa PCYOX1 o la lipoxigenasa ALOX15. Otro gen relacionado con estrés y sobreexpresado en las pacientes con PCOS es DNAJB14, que codifica para la proteína de choque térmico Hsp40. Según un trabajo previo de *microarrays*, la expresión de dicho gen está también aumentada en el tejido ovárico de pacientes con PCOS (Jansen *et al.*, 2004).

El gen ALDH1A3, que muestra una expresión reducida en los individuos con PCOS, codifica una enzima aldehído deshidrogenasa implicada en la detoxificación de aldehídos que se producen durante procesos de peroxidación lipídica. Dada la gran susceptibilidad de los adipocitos al daño oxidativo por su elevado contenido lipídico, la desregulación de este gen puede contribuir al estrés oxidativo derivado del metabolismo de lípidos oxidados y, con ello, al desarrollo de resistencia a insulina. Nuestro resultado concuerda con la observación previa del aumento de los marcadores de peroxidación lipídica en mujeres con PCOS, positivamente correlacionado con parámetros de sensibilidad a insulina (Gonzalez *et al.*, 2006b; Sabuncu *et al.*, 2001). En esta misma línea, las enzimas aldehído deshidrogenasas pueden ser dianas transcripcionales de la señalización de insulina, como FALDH (*Fatty Aldehyde Dehydrogenase*), cuya expresión se encuentra inhibida en estados de hiperinsulinemia, resistencia a insulina y diabetes de tipo I (Demozay *et al.*, 2004).

Otro resultado que sugiere que en el tejido adiposo de pacientes con PCOS pueda existir un incremento en la producción de especies ROS, es la desregulación de dos enzimas implicadas en el metabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En el estudio de expresión diferencial de proteínas, hemos observado la reducción en los niveles de peroxirredoxina 2 (PrxII), una peroxidasa citosólica que media la degradación de H_2O_2 por reducción con glutatión u otros tioles. Es interesante destacar que el gen PrxII se localiza en la región cromosómica 19p13.2, una región candidata de susceptibilidad para el PCOS (Urbanek *et al.*, 2005). Por otro lado, hemos detectado un aumento en la expresión génica de una tioéter oxidasa, PCYOX1, que origina H_2O_2 como producto secundario a partir de la degradación de prenilcisteínas (Digits *et al.*, 2002). La desregulación de estas dos enzimas con efectos opuestos podría reflejar un aumento neto en las concentraciones de H_2O_2 en el tejido adiposo de las pacientes en estudio. En relación con esta hipótesis, se ha descrito que las mujeres con PCOS presentan aumento del daño en el ADN inducido por H_2O_2 , hecho que

podría explicar el aumento de la susceptibilidad a cáncer de endometrio en el PCOS (Dinger *et al.*, 2005).

El aumento de la expresión del gen ALOX15 en el tejido adiposo de las mujeres con PCOS también puede contribuir a la mayor producción de moléculas ROS. Este gen codifica una enzima 12/15-lipoxigenasa (12/15-LO) que cataliza la oxidación de varios tipos de ácidos grasos, principalmente araquidónico y linoléico, produciendo distintos tipos de lípidos oxidados con función inflamatoria (Kuhn *et al.*, 1999). Entre ellos, los ácidos hidroxiicoastetraenoicos (HETEs) han sido implicados en la patogénesis de la hipertensión, aterosclerosis, resistencia a insulina y diabetes (Folcik *et al.*, 1995; Natarajan & Nadler, 2004). Existen numerosas evidencias que apoyan el papel de las enzimas 12/15-LO en el desarrollo de las alteraciones vasculares e inflamatorias en estados prediabéticos de resistencia a insulina. Así, los inhibidores de lipoxigenasas mejoran la sensibilidad a la insulina en modelos de ratón con insulinoresistencia (Reed *et al.*, 1999), y algunos productos de la actividad 12-LO disminuyen la captación de glucosa *in vitro* (Alpert *et al.*, 2002). Todas estas evidencias hacen pensar que la sobreexpresión de ALOX15 en el tejido adiposo de pacientes PCOS podría estar relacionada con las alteraciones asociadas a la resistencia a insulina.

Además de alteraciones en genes que podrían estar implicados en la producción de ROS, nuestros resultados muestran que, por otro lado, genes con función detoxificante presentan aumentos en su expresión en el tejido adiposo de las pacientes PCOS, incluyendo NQO1, genes de la familia GSTM y de la familia AKR. La expresión de todos ellos está inducida por especies electrófilas, derivadas del estrés oxidativo o de la degradación de drogas, a través de elementos de regulación ARE (*Antioxidant Response Element*) para el activador transcripcional Nrf2 (Hayes *et al.*, 2005; Nioi *et al.*, 2003; Rushmore *et al.*, 1991), lo que parece indicar la inducción de genes de respuesta a estrés oxidativo en el tejido adiposo de las pacientes PCOS. Este resultado puede reflejar un mecanismo compensatorio que se produce con el fin de reducir los niveles de estrés oxidativo. Esta misma idea ha sido propuesta por los autores de un trabajo que describe el aumento de los niveles de la proteína antioxidante superóxido dismutasa en pacientes con PCOS (Sabuncu *et al.*, 2001).

La ruta del metabolismo del glutatión se encuentra significativamente alterada en los pacientes PCOS, tal como se refleja en el estudio de la búsqueda de funciones desreguladas llevado a cabo con la herramienta bioinformática FatiScan. Dentro de esta ruta, la familia génica de enzimas glutatión S-transferasa de tipo M (GSTMs) presenta un aumento de expresión coordinado en los pacientes con PCOS (Figura 4.4A). El glutatión en su forma reducida (GSH) es la principal molécula tamponadora de especies oxidadas por estrés

oxidativo y, de hecho, se puede definir el estado redox de una célula por el ratio entre GSH y su forma oxidada (GSSH) (Dickinson & Forman, 2002). En estados severos de estrés oxidativo, el contenido en GSH se reduce por el aumento de la reacción de conjugación, mediada por enzimas glutathion S-transferasas, a compuestos electrofílicos y productos oxidados derivados del estrés oxidativo, tales como lípidos peroxidados y, en consecuencia, las defensas celulares contra ROS se ven disminuidas (Pompella *et al.*, 2003). Dado que el aumento de especies ROS conduce a una reducción de la sensibilidad a la insulina (Rudich *et al.*, 1998; Tirosh *et al.*, 1999), todo efecto que conlleve la disminución de los niveles de GSH puede contribuir al desbalance redox que acompaña a los estados de insulinoresistencia (Khamaisi *et al.*, 2000), de modo que la sobreexpresión de estas enzimas podría tener un efecto rebote sobre la sensibilidad a insulina. Por tanto, la inducción de la expresión de los genes GSTMs en las pacientes PCOS se podría producir en respuesta al estrés oxidativo, quizás asociado a un estado de resistencia a insulina, pero no se puede descartar que se produzca asimismo en sinergia con el hiperandrogenismo de las pacientes, ya que existen evidencias de la activación de GSTMs por andrógenos (Catania *et al.*, 2000). Sustentando esta hipótesis, se ha descrito que pacientes con PCOS presentan disminución significativa en los niveles de GSH en comparación con mujeres control (Dinger *et al.*, 2005; Sabuncu *et al.*, 2001).

Nuestro trabajo ha permitido destacar alteraciones en distintos genes, proteínas y procesos biológicos implicados en rutas de estrés oxidativo. Estos resultados apoyan un posible papel de las especies ROS en los efectos patológicos de la insulinoresistencia e hiperandrogenismo en PCOS.

4.5.3. Evidencias de alteraciones en el metabolismo lipídico.

Nuestros resultados muestran que la expresión de diversos genes implicados en la regulación de la homeostasis lipídica se encuentra desregulada en el tejido adiposo de pacientes con PCOS. Tal como se refleja en el análisis de GO (Tabla 4.9), la biosíntesis de ácidos grasos estaría significativamente aumentada en las pacientes con PCOS. SCD, un gen lipogénico, así como PDE3B y NPR3, genes relacionados con la regulación de la lipólisis en tejido adiposo, presentan una expresión aumentada en estas pacientes. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los que se describen alteraciones en la función lipolítica en dicho tejido en el PCOS independientes del hiperandrogenismo (Arner, 2005; Ek *et al.*, 2002).

En estados de insulinoresistencia, las acciones de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa se encuentran inhibidas, sin embargo las acciones lipogénicas de la insulina no parecen estar afectadas. En concordancia con esta observación, el gen PDE3B, clave en la acción antilipolítica de la insulina en adipocitos, se encuentra sobreexpresado en el tejido adiposo de mujeres con PCOS. Dicho gen codifica para una fosfodiesterasa insulino dependiente que cataliza la hidrólisis de AMPc. La activación de dicha enzima disminuye los niveles intracelulares de AMPc, conduciendo a la inhibición de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y la lipasa HSL y, en último término, a la inhibición de la hidrólisis de triglicéridos (ver Figura 4.17). Otro gen antilipolítico con expresión aumentada en el tejido adiposo de pacientes con PCOS es NPR3, que codifica el receptor de péptidos natriuréticos de tipo C (NPR-C). Se ha demostrado recientemente que los péptidos natriuréticos ejercen un potente efecto lipolítico en adipocitos humanos (Sengenès *et al.*, 2000). La unión del péptido natriurético atrial (ANP) con receptores de tipo A (NPR-A) desencadena una cascada de activación mediada por GMPc que activa a la lipasa HSL de forma independiente a la insulina y promueve, por tanto, la lipólisis (Lafontan *et al.*, 2005). NPR-C presenta un efecto modulador sobre la acción lipolítica de los péptidos natriuréticos; la unión de NPR-C con el ANP, además de promover la captación e internalización de péptidos natriuréticos para su degradación lisosomal, activa una ruta de señalización mediada por fosfatidil-inositol que conduce a la disminución de los niveles de AMPc y, con ello, a la inhibición de la lipólisis (Anand-Srivastava, 2005). El aumento de la expresión de genes antilipolíticos puede reflejar un efecto compensatorio para contrarrestar el incremento de la lipólisis inducida por catecolaminas en el tejido adiposo visceral de mujeres con PCOS, tal como ha sido observado en otros trabajos (Arner, 2005; Ek *et al.*, 2002).

El gen SCD codifica la esteroil-CoA desaturasa, enzima lipogénica que participa en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados a partir de ácidos grasos saturados. La actividad SCD tiene un importante papel en la homeostasis lipídica y regulación de peso corporal y es considerada como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. La expresión de SCD está regulada por factores hormonales y nutricionales, incluyendo insulina, corticoides, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados (Ntambi & Miyazaki, 2003). Numerosas evidencias sugieren una posible relación entre la actividad de SCD e insulinoresistencia. Así, ratones deficientes para SCD muestran un aumento en la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético y tejido adiposo marrón mediante la acción de varios mecanismos como la activación de componentes de la ruta de señalización de insulina (IRS1, p85 α , Akt), el incremento de la expresión de GLUT4 y la

disminución de PTP-1P (Rahman *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2005). Asimismo, se ha visto que la droga antidiabética troglitazona inhibe la expresión de SCD en adipocitos 3T3L1 (Kim & Ntambi, 1999). Aunque el aumento en la expresión de SCD en las pacientes con PCOS parece estar relacionado con un estado de insulinoresistencia, en este trabajo no podemos determinar si se produce de forma secundaria a la hiperinsulinemia o a otros factores, o bien si se trata de un defecto primario del PCOS que pudiera contribuir al desarrollo de la patología.

En el estudio de la expresión diferencial de proteínas hemos observado una disminución en los niveles de apolipoproteína A1, el principal componente proteico de las partículas HDL, en el tejido adiposo de pacientes con PCOS. Esta proteína participa en el metabolismo del colesterol promoviendo su retirada de los tejidos periféricos para su posterior excreción. En concordancia con este resultado, las pacientes de nuestro estudio muestran una disminución en los niveles plasmáticos de partículas de HDL-colesterol que roza la significancia estadística con respecto a los individuos control. Las consecuencias patológicas asociadas a los niveles bajos de HDL-c y ApoA1 incluyen dislipidemia asociada a síndromes de insulinoresistencia (Reaven, 2002) y aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis (Luc *et al.*, 2002). Nuestro resultado está en concordancia con estudios previos que describen una disminución en la concentración de partículas HDL en mujeres con PCOS (Rajkhowa *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1996), y de los niveles plasmáticos de ApoA1 (Maitra *et al.*, 2001; Yilmaz *et al.*, 2005a). Está asimismo ampliamente constatado que las mujeres con PCOS presentan un aumento en el riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares en comparación con mujeres control de la misma edad y peso (Legro, 2003). Por tanto, la disminución en la expresión de ApoA1 en tejido adiposo omental puede ser un reflejo de alteraciones del perfil lipídico a nivel plasmático, además de un indicador del riesgo cardiovascular de estas pacientes. Es preciso añadir que se desconoce si la disminución en los niveles de HDL-c y ApoA1 en el PCOS es el resultado de una combinación de factores, donde la obesidad juega un papel fundamental, o por el contrario, es independiente del IMC.

4.5.4. Evidencias de alteraciones en la ruta de señalización de Wnt.

Nuestros resultados evidencian la posible desregulación de la ruta de señalización mediada por las proteínas Wnt/ β -catenina en el tejido adiposo de pacientes con PCOS. Llegamos a esta conclusión después de integrar los resultados del análisis de expresión génica diferencial con el posterior análisis de correulación. Hemos observado la represión de un antagonista

de la señalización por Wnt, DKK1, y la sobreexpresión de un efector transcripcional de la misma ruta, TCF4. Además, hemos identificado grupos de genes coexpresados que presentan posibles elementos comunes de unión para efectores transcripcionales de la ruta Wnt/ β -catenina, tal como se ha comentado previamente (Figura 4.2). Un grupo de genes con expresión aumentada en pacientes con PCOS presentan en su promotor sitios comunes de unión a TCF4, gen de igual forma aumentado en estas pacientes. Por tanto, sería razonable pensar que la desregulación de estos genes es una consecuencia del aumento en la expresión de dicho factor de transcripción. Entre estos genes, se incluye FGF9, una conocida diana transcripcional de la ruta de Wnt, lo que apoya la validez de los análisis realizados. Estos resultados, junto a la observación de que el proceso de GO *actividad inhibidora de la ruta de Wnt* (Tabla 4.9) se encuentra reprimido en el grupo de pacientes con PCOS, podrían indicar que la actividad transcripcional de la ruta de Wnt estaría aumentada en las mujeres con PCOS.

Además, hemos encontrado que un grupo de genes con enriquecimiento para sitios de unión a LEF1 se encuentra reprimido en PCOS. En este grupo, se incluyen dos genes previamente descritos como dianas transcripcionales de Wnt/ β -catenina, como son CD44 y el mismo gen DKK1 (Niida *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2003). La activación de la ruta mediada por Wnt/ β -catenina induce la expresión de DKK1 mediante un mecanismo de *feedback* negativo de regulación (Niida *et al.*, 2004). En nuestros resultados, observamos una disminución en la expresión de DKK1, un efecto opuesto al esperado si la ruta de Wnt estuviera sobreactivada. Este mismo efecto ha sido descrito en otras situaciones patológicas como es el cáncer colorectal, en donde se ha descrito que a pesar de existir una alta actividad transcripcional de TCF en biopsias de tumores, la expresión de DKK1 se encuentra inhibida (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005). La explicación más razonable a este efecto aparentemente discrepante es que la patología en estudio provoque la desregulación del mecanismo autorregulador de la señalización de Wnt.

La ruta de señalización de Wnt había sido implicada previamente en la fisiopatología del PCOS a nivel ovárico por otros estudios de expresión génica utilizando *microarrays* (Jansen *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2003), de modo que nuestros resultados en otro tejido confirman estas observaciones. El hecho de que esta ruta participe en la regulación del desarrollo folicular y ovulación (Richards *et al.*, 2002), y de la adipogénesis (Kennell & MacDougald, 2005; Ross *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2005), explicaría que la desregulación en el PCOS ocurra aparentemente en diferentes tejidos. Existen evidencias para una interconexión entre la ruta de Wnt y la acción de los andrógenos. Así, Wnt4 presenta actividad antiandrogénica implicada en el

mantenimiento de los oocitos y en el desarrollo de los caracteres femeninos (Heikkilä, 2005). Por otro lado, los andrógenos inhiben la diferenciación adipogénica en células 3T3L1 mediante la activación de Wnt (Singh *et al.*, 2005). Todo ello nos hace pensar que pueda existir una posible relación entre la desregulación observada en la ruta Wnt/ β -catenina con el hiperandrogenismo asociado al PCOS.

4.5.5. Evidencias de alteraciones en genes relacionados con el Síndrome Metabólico.

Algunos de los genes con expresión aumentada en el tejido adiposo de las pacientes con PCOS, como HSD11B1 y el gen de la leptina, habían sido previamente implicados en la fisiopatología del PCOS debido a su relación con síndrome metabólico y obesidad.

El gen HSD11B1 codifica la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 β -HSD1), implicada en la activación de glucocorticoides en tejidos diana. Así, esta oxidorreductasa regenera cortisol a partir de cortisona a través de su actividad NADPH reductasa. La relación entre el exceso de cortisol y el desarrollo de resistencia a insulina está ampliamente demostrada tanto en modelos de ratones transgénicos (Masuzaki *et al.*, 2001; Masuzaki *et al.*, 2003), como en pacientes con síndrome de Cushing's, síndrome metabólico o diabetes (Abdallah *et al.*, 2005; Tomlinson & Stewart, 2004; Wake & Walker, 2004). Las alteraciones en el metabolismo de los glucocorticoides en el PCOS están ampliamente descritas en la literatura (Doi *et al.*, 2005; Moran & Azziz, 2001; Rosenfield, 1999). Así, se ha observado que los pacientes con PCOS presentan tasas anormales en la excreción urinaria de metabolitos del cortisol con respecto a mujeres control, lo que indica disfunciones en la actividad de la enzima 11 β -HSD (Rodin *et al.*, 1994; Tsilchorozidou *et al.*, 2003). El aumento en la expresión de HSD11B1 observado en el tejido adiposo de las pacientes con PCOS podría incrementar los niveles de cortisol en dicho tejido, los cuales a su vez contribuirían, de forma autocrina o paracrina, al desarrollo de resistencia a insulina. Dadas las limitaciones en la disponibilidad de las muestras, en este trabajo no ha sido posible el estudio de la actividad enzimática de 11 β -HSD en las pacientes. Sin embargo, no se observan diferencias en la expresión de dicha proteína en un análisis por *Western blot*.

Hemos encontrado que la expresión del gen de la leptina está aumentada en el tejido adiposo de pacientes con PCOS respecto a los controles, todos ellos con el mismo grado de obesidad. En este sentido, se ha descrito que las pacientes con PCOS presentan aumentos en la concentración sérica de leptina que correlacionan positivamente con los niveles de insulina

y testosterona libre (Brzechffa *et al.*, 1996). Sin embargo, estos resultados discrepan con los obtenidos por otros trabajos (Goumenou *et al.*, 2003). A pesar de los resultados clínicos contradictorios, los estudios funcionales sobre la leptina evidencian un posible papel en la fisiopatología del PCOS. Además de ejercer una importante acción reguladora sobre la ingesta y el gasto de energía, la leptina participa en otras muchas funciones como en reproducción, respuesta inmune e inflamación, regulación del metabolismo de glucosa y secreción de insulina. Por tanto, el aumento de la expresión de leptina en el tejido adiposo, su principal sitio de producción en el organismo, puede afectar a diferentes tejidos implicados en PCOS y, por tanto, contribuir a las características clínicas del PCOS, como en la resistencia a insulina y anovulación. En este sentido, se ha descrito que la leptina interfiere con la producción de esteroides en las células de la granulosa, afectando de forma negativa a la ovulación, lo que podría indicar un posible papel en las disfunciones ováricas de las mujeres con PCOS (Zachow & Magoffin, 1997).

La disregulación de la leptina en pacientes con PCOS no parece ser un defecto primario, sino que se produce de forma asociada a una hiperinsulinemia o a un aumento de las concentraciones locales de cortisol (Halleux *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000). En este sentido, tal como se muestra en nuestro estudio de coexpresión, la expresión de los genes de la leptina y HSD11B1 parece estar coordinada, ya que ambos presentan un patrón de expresión similar y comparten sitios de unión al factor de transcripción HNF4, lo que puede indicar una relación funcional. De hecho, ratones transgénicos con sobreexpresión selectiva de HSD11B1 en tejido adiposo presentan resistencia a insulina, obesidad central y dislipidemia, además de un aumento de los niveles de leptina (Masuzaki *et al.*, 2001), características similares a las que presentan las pacientes de nuestro estudio.

Tanto el gen de la leptina como HSD11B1 han sido propuestos como genes candidatos para el PCOS sin que se hayan obtenido resultados concluyentes (Gambineri *et al.*, 2006; Oksanen *et al.*, 2000; San Millan *et al.*, 2005; Urbanek *et al.*, 1999).

4.5.6. Evidencias de alteraciones en la esteroidogénesis.

El origen del hiperandrogenismo en el PCOS reside principalmente en el aumento de la producción ovárica y adrenal de andrógenos (Rosenfield, 1999), pero la producción esteroidogénica en tejidos periféricos puede contribuir también de forma significativa al exceso androgénico asociado a este síndrome (Fassnacht *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2004). En los últimos años, se ha descrito que en el tejido adiposo se produce la expresión de enzimas

esteroidogénicas, indicando que la síntesis de andrógenos puede tener lugar en este tejido (Belanger *et al.*, 2002). Entre ellas, la enzima aldo-keto reductasa AKR1C3 (17- β HSD-5) parece ser la principal responsable de la activación de testosterona en el tejido adiposo (Luu-The *et al.*, 2001). En este sentido, nuestro trabajo refleja cambios en la expresión de este gen, entre otros de la familia AKR1C, principales reguladores de la interconversión de esteroides sexuales a nivel de prerreceptor (Adamski & Jakob, 2001).

4.5.7. Evidencias de alteraciones en funciones inmunológicas.

Hemos encontrado que varios genes que pertenecen al sistema inmune presentan expresión alterada en PCOS, incluyendo moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, como HLA-DQA1, DQB1, DRB3; distintas cadenas de inmunoglobulinas G (IGKC, IGKV, IGLJ, IGLV), el factor BF del complemento, FCGR1A y ARTS-1. En concordancia con estos resultados, otros estudios han relacionado la susceptibilidad al PCOS con el sistema HLA (Kaibe *et al.*, 2006; Ober *et al.*, 1992).

Está descrito que durante el desarrollo de la obesidad se produce la extravación y acumulación de macrófagos en el tejido adiposo. Dadas las limitaciones en la obtención y manipulación de las biopsias, no hemos podido determinar la composición celular del tejido adiposo omental en los individuos en estudio. Por ello, no podemos descartar que la desregulación de moléculas con función inmunológica se deba a diferencias en el contenido en macrófagos en el tejido adiposo en los individuos estudiados. Sin embargo, se ha descrito un patrón de expresión similar de genes inmunológicos en los ovarios de mujeres con PCOS (Jansen *et al.*, 2004), lo que apoyaría que la desregulación de estos genes pudiera ser una consecuencia directa de la enfermedad.

Es preciso añadir que un gran número de estudios apoyan la utilización de técnicas de genómica y proteómica como estrategias idóneas para la identificación de genes y rutas bioquímicas alteradas en estados patológicos. Sin embargo, hay que ser conscientes de las limitaciones que conllevan estos métodos en determinados tipos de estudios. Así, el pequeño tamaño muestral de nuestro estudio, derivado de la dificultad para obtener las biopsias de tejido adiposo, ha limitado el poder para detectar un mayor número de diferencias significativas de expresión entre los dos grupos, y ha contribuido a la falta de significancia estadística en las diferencias observadas entre pacientes y controles para algunos de los parámetros clínicos, como en el caso de los índices de insulinoresistencia. De igual forma, no podemos concluir si la

desregulación en la expresión de algunos de los genes o proteínas se debe a la acción directa del exceso androgénico, de la insulinoresistencia o bien, si es un defecto primario en el tejido adiposo que pudiese influir en la fisiopatología del PCOS. Asimismo, es necesario tener en consideración que los resultados aquí presentados se han obtenido en una población de mujeres con obesidad mórbida y que, tal vez, no deberían ser extrapolados a mujeres delgadas o con estados de obesidad menos severos.

En este trabajo se demuestra, por vez primera, la existencia de cambios en el perfil génico y proteico del tejido adiposo omental en pacientes con PCOS en comparación con individuos control no hiperandrogénicos. Hemos podido evidenciar que en el tejido adiposo de pacientes PCOS no sólo se encuentran desregulados genes/proteínas implicados en la señalización de insulina, sino también en otros procesos biológicos, entre otros, estrés oxidativo, señalización de Wnt e inflamación. La identificación de varias rutas biológicas alteradas sugiere la participación del tejido adiposo visceral en el desarrollo del PCOS y que sus complicaciones metabólicas no están limitadas a la influencia de la obesidad sobre la insulinoresistencia. Es de esperar que una posterior caracterización funcional de los genes, proteínas y rutas biológicas aquí identificados, así como el estudio de su relación con el PCOS en otros grupos subclínicos, puedan contribuir a aumentar el conocimiento sobre la fisiopatología de este síndrome.

5. CONCLUSIONES

1. En el estudio de asociación no se han identificado variantes alélicas de susceptibilidad para el PCOS en los genes candidatos estudiados, reafirmando que el componente ambiental, los criterios en el diagnóstico del PCOS, así como el tamaño y la homogeneidad de la población son factores importantes a tener en cuenta en el diseño del estudio.
2. Este trabajo describe por primera vez la existencia de cambios en la expresión de genes y proteínas en el tejido adiposo omental de pacientes afectadas por PCOS en comparación con mujeres no hiperandrogénicas, por lo tanto las alteraciones moleculares en dicho tejido influyen en la fisiopatología del PCOS, confirmando resultados previos.
3. La aplicación de técnicas de *microarrays* y PCR cuantitativa ha revelado genes con diferencias significativas de expresión entre los dos grupos estudiados, los cuales están implicados en diversos procesos como la regulación de la acción de la insulina, procesos oxidativos, la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina y procesos de estrés oxidativo.
4. Se han identificado grupos de genes con expresión similar entre los genes desregulados en el PCOS. Posiblemente algunos de estos grupos podrían estar corregulados por factores de transcripción previamente relacionados con la patogénesis de la insulinoresistencia y diabetes *mellitus* de tipo 2.
5. Este estudio ha destacado distintos procesos biológicos activados y reprimidos en el tejido adiposo omental en el PCOS, destacando procesos de oxidorreducción y estrés oxidativo.
6. Durante el curso de este trabajo, se han optimizado protocolos para la extracción y separación de proteínas del tejido adiposo humano en geles bidimensionales de proteínas, con el fin de llevar a cabo un estudio de proteómica comparativa.
7. La aplicación de dicha técnica ha destacado proteínas con expresión diferencial en el tejido adiposo omental de mujeres con PCOS, relacionadas con estrés oxidativo, metabolismo de la glucosa y metabolismo del colesterol.

8. El gen GSTM3 presenta cambios significativos de expresión tanto a nivel transcripcional como proteico, lo que reafirma la importancia de los mecanismos de regulación del estrés oxidativo en el tejido adiposo en el PCOS.
9. Los genes y proteínas identificados en este trabajo se pueden considerar como nuevos genes candidatos para explicar la etiología del PCOS y, de esta forma, quedan abiertas un considerable número de hipótesis que deberán ser confirmadas mediante los correspondientes estudios funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, B. M., Beck-Nielsen, H., & Gaster, M. (2005): Increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in type 2 diabetic myotubes. *Eur J Clin Invest* **35**, 627-34.
- Abdel Gadir, A., Khatim, M. S., Mowafi, R. S., Alnaser, H. M., Muharib, N. S., & Shaw, R. W. (1992): Implications of ultrasonically diagnosed polycystic ovaries. I. Correlations with basal hormonal profiles. *Hum Reprod* **7**, 453-7.
- Adams, J., Polson, D. W., & Franks, S. (1986): Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation & idiopathic hirsutism. *Br Med J (Clin Res Ed)* **293**, 355-9.
- Adamski, J., and Jakob, F. J. (2001): A guide to 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* **171**, 1-4.
- Akerblad, P., Lind, U., Liberg, D., Bamberg, K., and Sigvardsson, M. (2002): Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **22**, 8015-25.
- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., and Dopazo, J. (2005a): Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information. *Bioinformatics* **21**, 2988-93.
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Vaquerizas, J. M., Conde, L., and Dopazo, J. (2005b): BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* **33**, W460-4.
- Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., and Currie, I. (2003): A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3**, 36-44.
- Alpert, E., Gruzman, A., Totary, H., Kaiser, N., Reich, R., and Sasson, S. (2002): A natural protective mechanism against hyperglycaemia in vascular endothelial and smooth-muscle cells: role of glucose and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Biochem J* **362**, 413-22.
- Anand-Srivastava, M. B. (2005): Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* **26**, 1044-59.
- Apridonidze, T., Essah, P. A., Iuorno, M. J., and Nestler, J. E. (2005): Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 1929-35.
- Apter, D., Butzow, T., Laughlin, G. A., and Yen, S. S. (1995): Metabolic features of polycystic ovary syndrome are found in adolescent girls with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 2966-73.
- Arner, P. (2005): Effects of testosterone on fat cell lipolysis. Species differences and possible role in polycystic ovarian syndrome. *Biochimie* **87**, 39-43.
- Ashburner, M., and Lewis, S. (2002): On ontologies for biologists: the Gene Ontology--untangling the web. *Novartis Found Symp* **247**, 66-80; discussion 80-3, 84-90, 244-52.
- Asuncion, M., Calvo, R. M., San Millan, J. L., Sancho, J., Avila, S., and Escobar-Morreale, H. F. (2000): A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2434-8.
- Atiomo, W. U., Bates, S. A., Condon, J. E., Shaw, S., West, J. H., and Prentice, A. G. (1998): The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **69**, 236-41.
- Atiomo, W. U., Fox, R., Condon, J. E., Shaw, S., Friend, J., Prentice, A. G., and Wilkin, T. J. (2000): Raised plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is not an independent risk factor in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)* **52**, 487-92.
- Azziz, R., and Owerbach, D. (1995): Molecular abnormalities of the 21-hydroxylase gene in hyperandrogenic women with an exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to short-term adrenal stimulation. *Am J Obstet Gynecol* **172**, 914-8.
- Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., Janssen, O. E., Legro, R. S., Norman, R. J., Taylor, A. E., and Witchel, S. F. (2006): Position Statement: Criteria For Defining Polycystic Ovary Syndrome As A Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Baillargeon, J. P., Jakubowicz, D. J., Iuorno, M. J., Jakubowicz, S., and Nestler, J. E. (2004): Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertil Steril* **82**, 893-902.
- Baillargeon, J. P., and Nestler, J. E. (2006): Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 22-4.

- Bakay, M., Chen, Y. W., Borup, R., Zhao, P., Nagaraju, K., and Hoffman, E. P. (2002): Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC Bioinformatics* **3**, 4.
- Bandyopadhyay, G. K., Yu, J. G., Ofrecio, J., and Olefsky, J. M. (2005): Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* **54**, 2351-9.
- Barash, Y., Dehan, E., Krupsky, M., Franklin, W., Geraci, M., Friedman, N., and Kaminski, N. (2004): Comparative analysis of algorithms for signal quantitation from oligonucleotide microarrays. *Bioinformatics* **20**, 839-46.
- Barber, T. M., McCarthy, M. I., Wass, J. A., and Franks, S. (2006): Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **65**, 137-45.
- Barnes, R. B., and Lobo, R. A. (1985): Central opioid activity in polycystic ovary syndrome with and without dopaminergic modulation. *J Clin Endocrinol Metab* **61**, 779-82.
- Barontini, M., Garcia-Rudaz, M. C., and Veldhuis, J. D. (2001): Mechanisms of hypothalamic-pituitary-gonadal disruption in polycystic ovarian syndrome. *Arch Med Res* **32**, 544-52.
- Bastard, J. P., Grimaldi, A., Jardel, C., Porquet, D., Bruckert, E., and Hainque, B. (1997): A simple index of insulin resistance. *Diabetes Metab* **23**, 87-8.
- Bedecarrats, G. Y., O'Neill, F. H., Norwitz, E. R., Kaiser, U. B., and Teixeira, J. (2003): Regulation of gonadotropin gene expression by Mullerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9348-53.
- Belanger, C., Luu-The, V., Dupont, P., and Tchernof, A. (2002): Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res* **34**, 737-45.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal. Stat. Soc.* **57**, 289-300.
- bin Ali, A., Zhang, Q., Lim, Y. K., Fang, D., Retnam, L., and Lim, S. K. (2003): Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med* **34**, 824-9.
- Blalock, E. M., Geddes, J. W., Chen, K. C., Porter, N. M., Markesbery, W. R., and Landfield, P. W. (2004): Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2173-8.
- Book, C. B., and Dunaif, A. (1999): Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3110-6.
- Borgfeldt, C., and Andolf, E. (1999): Transvaginal sonographic ovarian findings in a random sample of women 25-40 years old. *Ultrasound Obstet Gynecol* **13**, 345-50.
- Brophy, V. H., Jampsa, R. L., Clendenning, J. B., McKinstry, L. A., Jarvik, G. P., and Furlong, C. E. (2001): Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* **68**, 1428-36.
- Brownlee, M. (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-20.
- Brzechffa, P. R., Jakimiuk, A. J., Agarwal, S. K., Weitsman, S. R., Buyalos, R. P., and Magoffin, D. A. (1996): Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 4166-9.
- Burczynski, M. E., Peterson, R. L., Twine, N. C., Zuberek, K. A., Brodeur, B. J., Casciotti, L., Maganti, V., Reddy, P. S., Strahs, A., Immermann, F., Spinelli, W., Schwertschlag, U., Slager, A. M., Cotreau, M. M., and Dorner, A. J. (2006): Molecular classification of Crohn's disease and ulcerative colitis patients using transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Diagn* **8**, 51-61.
- Burghen, G. A., Givens, J. R., and Kitabchi, A. E. (1980): Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* **50**, 113-6.
- Carey, A. H., Chan, K. L., Short, F., White, D., Williamson, R., and Franks, S. (1993): Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol (Oxf)* **38**, 653-8.
- Carey, A. H., Waterworth, D., Patel, K., White, D., Little, J., Novelli, P., Franks, S., and Williamson, R. (1994): Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet* **3**, 1873-6.

- Carmina, E., Chu, M. C., Longo, R. A., Rini, G. B., and Lobo, R. A. (2005a): Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 2545-9.
- Carmina, E., Orio, F., Palomba, S., Cascella, T., Longo, R. A., Colao, A. M., Lombardi, G., and Lobo, R. A. (2005b): Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* **152**, 389-94.
- Carmina, E., Orio, F., Palomba, S., Longo, R. A., Cascella, T., Colao, A., Lombardi, G., Rini, G. B., and Lobo, R. A. (2006): Endothelial dysfunction in PCOS: role of obesity and adipose hormones. *Am J Med* **119**, 356 e1-6.
- Catania, V. A., Luquita, M. G., Sanchez Pozzi, E. J., and Mottino, A. D. (2000): Quantitative and qualitative gender-related differences in jejunal glutathione S-transferase in the rat effect of testosterone administration. *Life Sci* **68**, 467-74.
- Chang, W. Y., Knochenhauer, E. S., Bartolucci, A. A., and Azziz, R. (2005): Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. *Fertil Steril* **83**, 1717-23.
- Chunqiu Hou, J., and Pessin, J. E. (2003): Lipid Raft targeting of the TC10 amino terminal domain is responsible for disruption of adipocyte cortical actin. *Mol Biol Cell* **14**, 3578-91.
- Ciaraldi, T. P., el-Roeiy, A., Madar, Z., Reichart, D., Olefsky, J. M., and Yen, S. S. (1992): Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 577-83.
- Ciaraldi, T. P., Morales, A. J., Hickman, M. G., Odom-Ford, R., Olefsky, J. M., and Yen, S. S. (1997): Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1421-5.
- Clayton, R. N., Ogden, V., Hodgkinson, J., Worswick, L., Rodin, D. A., Dyer, S., and Meade, T. W. (1992): How common are polycystic ovaries in normal women and what is their significance for the fertility of the population? *Clin Endocrinol (Oxf)* **37**, 127-34.
- Conti, M. (2002): Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biol Reprod* **67**, 1653-61.
- Conway, G. S., Honour, J. W., and Jacobs, H. S. (1989): Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* **30**, 459-70.
- Corbould, A., Kim, Y. B., Youngren, J. F., Pender, C., Kahn, B. B., Lee, A., and Dunaif, A. (2005): Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E1047-54.
- Corton, M., Villuendas, G., Botella, J. I., San Millan, J. L., Escobar-Morreale, H. F., and Peral, B. (2004): Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* **4**, 438-41.
- Cresswell, J. L., Barker, D. J., Osmond, C., Egger, P., Phillips, D. I., and Fraser, R. B. (1997): Fetal growth, length of gestation, and polycystic ovaries in adult life. *Lancet* **350**, 1131-5.
- Crosignani, P. G., and Nicolosi, A. E. (2001): Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod Update* **7**, 3-7.
- Daneshmand, S., Weitsman, S. R., Navab, A., Jakimiuk, A. J., and Magoffin, D. A. (2002): Overexpression of theca-cell messenger RNA in polycystic ovary syndrome does not correlate with polymorphisms in the cholesterol side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase/C(17-20) lyase promoters. *Fertil Steril* **77**, 274-80.
- de Kretser, D. M., Hedger, M. P., Loveland, K. L., and Phillips, D. J. (2002): Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* **8**, 529-41.
- Demozay, D., Rocchi, S., Mas, J. C., Grillo, S., Pirola, L., Chavey, C., and Van Obberghen, E. (2004): Fatty aldehyde dehydrogenase: potential role in oxidative stress protection and regulation of its gene expression by insulin. *J Biol Chem* **279**, 6261-70.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A., and Trent, J. M. (1996): Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* **14**, 457-60.
- Dewailly, D. (1997): Definition and significance of polycystic ovaries. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* **11**, 349-68.
- Di Paola, R., Frittitta, L., Miscio, G., Bozzali, M., Baratta, R., Centra, M., Spampinato, D., Santagati, M. G., Ercolino, T., Cisternino, C., Soccio, T., Mastroianno, S., Tassi, V., Almgren, P., Pizzuti, A.,

- Vigneri, R., and Trischitta, V. (2002): A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance. *Am J Hum Genet* **70**, 806-12.
- Diamanti-Kandarakis, E., Mitrakou, A., Hennes, M. M., Platanissiotis, D., Kaklas, N., Spina, J., Georgiadou, E., Hoffmann, R. G., Kissebah, A. H., and Raptis, S. (1995): Insulin sensitivity and antiandrogenic therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* **44**, 525-31.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bartzis, M. I., Zapanti, E. D., Spina, G. G., Filandra, F. A., Tsianateli, T. C., Bergiele, A. T., and Kouli, C. R. (1999): Polymorphism T-->C (-34 bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **71**, 431-5.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bartzis, M. I., Bergiele, A. T., Tsianateli, T. C., and Kouli, C. R. (2000): Microsatellite polymorphism (tttta)(n) at -528 base pairs of gene CYP11alpha influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **73**, 735-41.
- Diamanti-Kandarakis, E., Palioniko, G., Alexandraki, K., Bergiele, A., Koutsouba, T., and Bartzis, M. (2004): The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol* **150**, 793-8.
- Diao, F. Y., Xu, M., Hu, Y., Li, J., Xu, Z., Lin, M., Wang, L., Zhou, Y., Zhou, Z., Liu, J., and Sha, J. (2004): The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. *J Mol Endocrinol* **33**, 59-72.
- Dickinson, D. A., and Forman, H. J. (2002): Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* **973**, 488-504.
- Digits, J. A., Pyun, H. J., Coates, R. M., and Casey, P. J. (2002): Stereospecificity and kinetic mechanism of human prenylcysteine lyase, an unusual thioether oxidase. *J Biol Chem* **277**, 41086-93.
- Dinger, Y., Akcay, T., Erdem, T., Ilker Saygili, E., and Gundogdu, S. (2005): DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* **65**, 721-8.
- Doi, S. A., Towers, P. A., Scott, C. J., and Al-Shoumer, K. A. (2005): PCOS: an ovarian disorder that leads to dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **118**, 4-16.
- Dooley, C. A., Attia, G. R., Rainey, W. E., Moore, D. R., and Carr, B. R. (2000): Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3331-7.
- Dowell, P., and Cooke, D. W. (2002): Olf-1/early B cell factor is a regulator of glut4 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **277**, 1712-8.
- Draghici, S., Khatri, P., Bhavsar, P., Shah, A., Krawetz, S. A., and Tainsky, M. A. (2003): Onto-Tools, the toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res* **31**, 3775-81.
- Dunaif, A., Graf, M., Mandeli, J., Laumas, V., and Dobrjansky, A. (1987): Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 499-507.
- Dunaif, A., Segal, K. R., Futterweit, W., and Dobrjansky, A. (1989): Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **38**, 1165-74.
- Dunaif, A., Xia, J., Book, C. B., Schenker, E., and Tang, Z. (1995): Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* **96**, 801-10.
- Dunaif, A., Scott, D., Finegood, D., Quintana, B., and Whitcomb, R. (1996): The insulin-sensitizing agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3299-306.
- Dunaif, A. (1997): Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* **18**, 774-800.
- Dunaif, A., Wu, X., Lee, A., and Diamanti-Kandarakis, E. (2001): Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E392-9.
- Eagleson, C. A., Gingrich, M. B., Pastor, C. L., Arora, T. K., Burt, C. M., Evans, W. S., and Marshall, J. C. (2000): Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4047-52.
- Eaves, I. A., Bennett, S. T., Forster, P., Ferber, K. M., Ehrmann, D., Wilson, A. J., Bhattacharyya, S., Ziegler, A. G., Brinkmann, B., and Todd, J. A. (1999): Transmission ratio distortion at the INS-IGF2 VNTR. *Nat Genet* **22**, 324-5.

- Ehrmann, D. A., Rosenfield, R. L., Barnes, R. B., Brigell, D. F., and Sheikh, Z. (1992): Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *N Engl J Med* **327**, 157-62.
- Ehrmann, D. A., Barnes, R. B., and Rosenfield, R. L. (1995): Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev* **16**, 322-53.
- Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J. P., Bornstein, S. R., Scherbaum, W. A., and Vinson, G. P. (1998): Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* **19**, 101-43.
- Ehrmann, D. A., Cavaghan, M. K., Imperial, J., Sturis, J., Rosenfield, R. L., and Polonsky, K. S. (1997a): Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 524-30.
- Ehrmann, D. A., Schneider, D. J., Sobel, B. E., Cavaghan, M. K., Imperial, J., Rosenfield, R. L., and Polonsky, K. S. (1997b): Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2108-16.
- Ehrmann, D. A., Barnes, R. B., Rosenfield, R. L., Cavaghan, M. K., and Imperial, J. (1999): Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* **22**, 141-6.
- Ehrmann, D. A., Schwarz, P. E., Hara, M., Tang, X., Horikawa, Y., Imperial, J., Bell, G. I., and Cox, N. J. (2002a): Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 1669-73.
- Ehrmann, D. A., Tang, X., Yoshiuchi, I., Cox, N. J., and Bell, G. I. (2002b): Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4297-300.
- Ehrmann, D. A. (2005): Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* **352**, 1223-36.
- Ek, I., Arner, P., Ryden, M., Holm, C., Thorne, A., Hoffstedt, J., and Wahrenberg, H. (2002): A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance. *Diabetes* **51**, 484-92.
- El Mkadem, S. A., Lautier, C., Macari, F., Molinari, N., Lefebvre, P., Renard, E., Gris, J. C., Cros, G., Daures, J. P., Bringer, J., White, M. F., and Grigorescu, F. (2001): Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **50**, 2164-8.
- Escobar-Morreale, H. F., Serrano-Gotarredona, J., Varela, C., Garcia-Robles, R., and Sancho, J. M. (1997): Circulating leptin concentrations in women with hirsutism. *Fertil Steril* **68**, 898-906.
- Escobar-Morreale, H. F., Botella-Carretero, J. I., Alvarez-Blasco, F., Sancho, J., and San Millan, J. L. (2005a): The polycystic ovary syndrome associated with morbid obesity may resolve after weight loss induced by bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 6364-9.
- Escobar-Morreale, H. F., Luque-Ramirez, M., and San Millan, J. L. (2005b): The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* **26**, 251-82.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. (2002): Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* **23**, 599-622.
- Fassnacht, M., Schlenz, N., Schneider, S. B., Wudy, S. A., Allolio, B., and Arlt, W. (2003): Beyond adrenal and ovarian androgen generation: Increased peripheral 5 alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2760-6.
- Faulds, G., Ryden, M., Ek, I., Wahrenberg, H., and Arner, P. (2003): Mechanisms behind lipolytic catecholamine resistance of subcutaneous fat cells in the polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2269-73.
- Fernandez-Real, J. M., and Ricart, W. (1999): Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia* **42**, 1367-74.
- Folcik, V. A., Nivar-Aristy, R. A., Krajewski, L. P., and Cathcart, M. K. (1995): Lipoxigenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **96**, 504-10.
- Franks, S. (1989): Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clin Endocrinol (Oxf)* **31**, 87-120.
- Franks, S. (1995): Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* **333**, 853-61.
- Franks, S., McCarthy, M. I., and Hardy, K. (2006): Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl* **29**, 278-85; discussion 286-90.

- Frittitta, L., Youngren, J., Vigneri, R., Maddux, B. A., Trischitta, V., and Goldfine, I. D. (1996): PC-1 content in skeletal muscle of non-obese, non-diabetic subjects: relationship to insulin receptor tyrosine kinase and whole body insulin sensitivity. *Diabetologia* **39**, 1190-5.
- Frittitta, L., Youngren, J. F., Sbraccia, P., D'Adamo, M., Buongiorno, A., Vigneri, R., Goldfine, I. D., and Trischitta, V. (1997): Increased adipose tissue PC-1 protein content, but not tumour necrosis factor- α gene expression, is associated with a reduction of both whole body insulin sensitivity and insulin receptor tyrosine-kinase activity. *Diabetologia* **40**, 282-9.
- Gaasenbeek, M., Powell, B. L., Sovio, U., Haddad, L., Gharani, N., Bennett, A., Groves, C. J., Rush, K., Goh, M. J., Conway, G. S., Ruokonen, A., Martikainen, H., Pouta, A., Taponen, S., Hartikainen, A. L., Halford, S., Jarvelin, M. R., Franks, S., and McCarthy, M. I. (2004): Large-scale analysis of the relationship between CYP11A promoter variation, polycystic ovarian syndrome, and serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2408-13.
- Gambineri, A., Pelusi, C., Vicennati, V., Pagotto, U., and Pasquali, R. (2002): Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**, 883-96.
- Gambineri, A., Vicennati, V., Genghini, S., Tomassoni, F., Pagotto, U., Pasquali, R., and Walker, B. R. (2006): Genetic Variation in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Gharani, N., Waterworth, D. M., Williamson, R., and Franks, S. (1996): 5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 4174.
- Gharani, N., Waterworth, D. M., Batty, S., White, D., Gilling-Smith, C., Conway, G. S., McCarthy, M., Franks, S., and Williamson, R. (1997): Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet* **6**, 397-402.
- Givens, J. R. (1988): Familial polycystic ovarian disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* **17**, 771-83.
- Glazier, A. M., Nadeau, J. H., and Aitman, T. J. (2002): Finding genes that underlie complex traits. *Science* **298**, 2345-9.
- Gonzalez-Sancho, J. M., Aguilera, O., Garcia, J. M., Pendas-Franco, N., Pena, C., Cal, S., Garcia de Herreros, A., Bonilla, F., and Munoz, A. (2005): The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **24**, 1098-103.
- Gonzalez, A., Abril, E., Roca, A., Aragon, M. J., Figueroa, M. J., Velarde, P., Ruiz, R., Favez, O., Galan, J. J., Herreros, J. A., Real, L. M., and Ruiz, A. (2003): Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5529-36.
- Gonzalez, A., Saez, M. E., Aragon, M. J., Galan, J. J., Vettori, P., Molina, L., Rubio, C., Real, L. M., Ruiz, A., and Ramirez-Lorca, R. (2006a): Specific haplotypes of the CALPAIN-5 gene are associated with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* **21**, 943-51.
- Gonzalez, F., Chang, L., Horab, T., and Lobo, R. A. (1996): Evidence for heterogeneous etiologies of adrenal dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **66**, 354-61.
- Gonzalez, F., Rote, N. S., Minium, J., and Kirwan, J. P. (2005): Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress In The Development Of Insulin Resistance And Hyperandrogenism In Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Gonzalez, F., Rote, N. S., Minium, J., and Kirwan, J. P. (2006b): Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 336-40.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-53.
- Goumenou, A. G., Matalliotakis, I. M., Koumantakis, G. E., and Panidis, D. K. (2003): The role of leptin in fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **106**, 118-24.
- Govind, A., Obhrai, M. S., and Clayton, R. N. (1999): Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 38-43.
- Group, R. E. A.-S. P. C. W. (2004): Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **81**, 19-25.

- Haap, M., Machicao, F., Stefan, N., Thamer, C., Tschritter, O., Schnuck, F., Wallwiener, D., Stumvoll, M., Haring, H. U., and Fritsche, A. (2005): Genetic determinants of insulin action in polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **113**, 275-81.
- Haddad, L., Evans, J. C., Gharani, N., Robertson, C., Rush, K., Wiltshire, S., Frayling, T. M., Wilkin, T. J., Demaine, A., Millward, A., Hattersley, A. T., Conway, G., Cox, N. J., Bell, G. I., Franks, S., and McCarthy, M. I. (2002): Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2606-10.
- Hakonarson, H., Bjornsdottir, U. S., Halapi, E., Bradfield, J., Zink, F., Mouy, M., Helgadottir, H., Gudmundsdottir, A. S., Andrason, H., Adalsteinsdottir, A. E., Kristjansson, K., Birkisson, I., Arnason, T., Andresdottir, M., Gislason, D., Gislason, T., Gulcher, J. R., and Stefansson, K. (2005): Profiling of genes expressed in peripheral blood mononuclear cells predicts glucocorticoid sensitivity in asthma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14789-94.
- Halleux, C. M., Servais, I., Reul, B. A., Detry, R., and Brichard, S. M. (1998): Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 902-10.
- Hara, M., Alcoser, S. Y., Qaadir, A., Beiswenger, K. K., Cox, N. J., and Ehrmann, D. A. (2002): Insulin resistance is attenuated in women with polycystic ovary syndrome with the Pro(12)Ala polymorphism in the PPARGgamma gene. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 772-5.
- Hatch, R., Rosenfield, R. L., Kim, M. H., and Tredway, D. (1981): Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* **140**, 815-30.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005): Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 51-88.
- Heinonen, S., Korhonen, S., Helisalmi, S., Koivunen, R., Tapanainen, J. S., and Laakso, M. (2004): The 121Q allele of the plasma cell membrane glycoprotein 1 gene predisposes to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **82**, 743-5.
- Heinonen, S., Korhonen, S., Helisalmi, S., Koivunen, R., Tapanainen, J., Hippelainen, M., and Laakso, M. (2005): Associations between two single nucleotide polymorphisms in the adiponectin gene and polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* **21**, 165-9.
- Herrero, J., Vaquerizas, J. M., Al-Shahrour, F., Conde, L., Mateos, A., Diaz-Uriarte, J. S., and Dopazo, J. (2004): New challenges in gene expression data analysis and the extended GEPAS. *Nucleic Acids Res* **32**, W485-91.
- Hillier, S. G., and Tetsuka, M. (1997): Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* **11**, 249-60.
- Ho, C. K., Wood, J. R., Stewart, D. R., Ewens, K., Ankener, W., Wickenheisser, J., Nelson-Degrave, V., Zhang, Z., Legro, R. S., Dunaif, A., McAllister, J. M., Spielman, R., and Strauss, J. F., 3rd (2005): Increased transcription and increased messenger ribonucleic acid (mRNA) stability contribute to increased GATA6 mRNA abundance in polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 6596-602.
- Hoffstedt, J., Andersson, I. L., Persson, L., Isaksson, B., and Arner, P. (2002): The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor -1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* **45**, 584-7.
- Homburg, R. (2002): What is polycystic ovarian syndrome? A proposal for a consensus on the definition and diagnosis of polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* **17**, 2495-9.
- Huang, H. J., Wu, J. C., Su, P., Zhirnov, O., and Miller, W. L. (2001): A novel role for bone morphogenetic proteins in the synthesis of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **142**, 2275-83.
- Hudson, R. W., Lochnan, H. A., Danby, F. W., Margesson, L. J., Strang, B. K., and Kimmett, S. M. (1990): 11 beta-hydroxyandrostenedione: a marker of adrenal function in hirsutism. *Fertil Steril* **54**, 1065-71.
- Humbert, R., Adler, D. A., Disteché, C. M., Hassett, C., Omiecinski, C. J., and Furlong, C. E. (1993): The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* **3**, 73-6.
- Ibanez, L., Dimartino-Nardi, J., Potau, N., and Saenger, P. (2000): Premature adrenarche-normal variant or forerunner of adult disease? *Endocr Rev* **21**, 671-96.
- Ibanez, L., Marcos, M. V., Potau, N., White, C., Aston, C. E., and Witchel, S. F. (2002): Increased frequency of the G972R variant of the insulin receptor substrate-1 (irs-1) gene among girls with a history of precocious pubarche. *Fertil Steril* **78**, 1288-93.

- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., and Speed, T. P. (2003): Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-64.
- Jahanfar, S., Eden, J. A., Nguyen, T., Wang, X. L., and Wilcken, D. E. (1997): A twin study of polycystic ovary syndrome and lipids. *Gynecol Endocrinol* **11**, 111-7.
- Jansen, E., Laven, J. S., Dommerholt, H. B., Polman, J., van Rijt, C., van den Hurk, C., Westland, J., Mosselman, S., and Fauser, B. C. (2004): Abnormal gene expression profiles in human ovaries from polycystic ovary syndrome patients. *Mol Endocrinol* **18**, 3050-63.
- Jarvinen, A. K., Hautaniemi, S., Edgren, H., Auvinen, P., Saarela, J., Kallioniemi, O. P., and Monni, O. (2004): Are data from different gene expression microarray platforms comparable? *Genomics* **83**, 1164-8.
- Jin, L., Zhu, X. M., Luo, Q., Qian, Y., Jin, F., and Huang, H. F. (2006): A novel SNP at exon 17 of INSR is associated with decreased insulin sensitivity in Chinese women with PCOS. *Mol Hum Reprod* **12**, 151-155.
- Kahsar-Miller, M. D., Nixon, C., Boots, L. R., Go, R. C., and Azziz, R. (2001): Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. *Fertil Steril* **75**, 53-8.
- Kaibe, M., Takakuwa, K., Murakawa, H., Ishii, K., Tamura, M., and Tanaka, K. (2006): Studies on the human leukocyte antigens in patients with polycystic ovary syndrome in a Japanese population--possible susceptibility of HLA-A11 and -DRB1*0403 to patient population with polycystic ovary syndrome. *Am J Reprod Immunol* **55**, 301-6.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., and Hattori, M. (2004): The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* **32**, D277-80.
- Kanzaki, M., and Pessin, J. E. (2001): Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J Biol Chem* **276**, 42436-44.
- Kanzaki, M., Watson, R. T., Hou, J. C., Stamnes, M., Saltiel, A. R., and Pessin, J. E. (2002): Small GTP-binding protein TC10 differentially regulates two distinct populations of filamentous actin in 3T3L1 adipocytes. *Mol Biol Cell* **13**, 2334-46.
- Kennell, J. A., and MacDougald, O. A. (2005): Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* **280**, 24004-10.
- Khamaisi, M., Kavel, O., Rosenstock, M., Porat, M., Yuli, M., Kaiser, N., and Rudich, A. (2000): Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine. *Biochem J* **349**, 579-86.
- Kim, Y. C., and Ntambi, J. M. (1999): Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 1-4.
- Kiriakidou, M., McAllister, J. M., Sugawara, T., and Strauss, J. F., 3rd (1996): Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 4122-8.
- Knudsen, S. (2002): *A Biologist's Guide to Analysis of DNA Microarray Data*. Wiley-Liss Ed. New York.
- Korhonen, S., Heinonen, S., Hiltunen, M., Helisalmi, S., Hippelainen, M., Koivunen, R., Tapanainen, J. S., and Laakso, M. (2003): Polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* **18**, 540-3.
- Kothapalli, R., Yoder, S. J., Mane, S., and Loughran, T. P., Jr. (2002): Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics* **3**, 22.
- Kratchmarova, I., Kalume, D. E., Blagoev, B., Scherer, P. E., Podtelejnikov, A. V., Molina, H., Bickel, P. E., Andersen, J. S., Fernandez, M. M., Bunkenborg, J., Roepstorff, P., Kristiansen, K., Lodish, H. F., Mann, M., and Pandey, A. (2002): A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics* **1**, 213-22.
- Kristiansen, S. B., Endoh, A., Casson, P. R., Buster, J. E., and Hornsby, P. J. (1997): Induction of steroidogenic enzyme genes by insulin and IGF-I in cultured adult human adrenocortical cells. *Steroids* **62**, 258-65.
- Kuhn, H., Heydeck, D., Brinckman, R., and Trebus, F. (1999): Regulation of cellular 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels. *Lipids* **34 Suppl**, S273-9.
- Lafontan, M., Moro, C., Sengenès, C., Galitzky, J., Crampes, F., and Berlan, M. (2005): An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides: the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2032-42.

- Lanne, B., Potthast, F., Hoglund, A., Brockenhuus von Lowenhielm, H., Nystrom, A. C., Nilsson, F., and Dahllof, B. (2001): Thiourea enhances mapping of the proteome from murine white adipose tissue. *Proteomics* **1**, 819-28.
- Lee, Y. H., Nair, S., Rousseau, E., Allison, D. B., Page, G. P., Tataranni, P. A., Bogardus, C., and Permana, P. A. (2005): Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia* **48**, 1776-83.
- Legro, R. S., Driscoll, D., Strauss, J. F., 3rd, Fox, J., and Dunaif, A. (1998a): Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14956-60.
- Legro, R. S., Finegood, D., and Dunaif, A. (1998b): A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2694-8.
- Legro, R. S., Spielman, R., Urbanek, M., Driscoll, D., Strauss, J. F., 3rd, and Dunaif, A. (1998c): Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res* **53**, 217-56.
- Legro, R. S. (2000): Is there a male phenotype in polycystic ovary syndrome families? *J Pediatr Endocrinol Metab* **13 Suppl 5**, 1307-9.
- Legro, R. S., Kunselman, A. R., and Dunaif, A. (2001): Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med* **111**, 607-13.
- Legro, R. S., and Strauss, J. F. (2002): Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **78**, 569-76.
- Legro, R. S. (2003): Polycystic ovary syndrome and cardiovascular disease: a premature association? *Endocr Rev* **24**, 302-12.
- Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. (2002): Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* **23**, 201-29.
- Li, M., Youngren, J. F., Dunaif, A., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Zhang, B. B., and Evans, J. L. (2002): Decreased insulin receptor (IR) autophosphorylation in fibroblasts from patients with PCOS: effects of serine kinase inhibitors and IR activators. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4088-93.
- Li, R., Phillips, D. M., and Mather, J. P. (1995): Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology* **136**, 849-56.
- Liovic, M., Prezelj, J., Kocijancic, A., Majdic, G., and Komel, R. (1997): CYP17 gene analysis in hyperandrogenised women with and without exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to ovarian stimulation. *J Endocrinol Invest* **20**, 189-93.
- Liu, G., Loraine, A., Shigeta R, Cline M, C. J., Valmeekam V, Sun S, Kulp D, and MA., S.-R. (2003): NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res* **31**, 82-86.
- Liu, Y. F., Herschkovitz, A., Boura-Halfon, S., Ronen, D., Paz, K., Leroith, D., and Zick, Y. (2004): Serine phosphorylation proximal to its phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance. *Mol Cell Biol* **24**, 9668-81.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. (1996): Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**, 1675-80.
- Love-Gregory, L. D., Wasson, J., Ma, J., Jin, C. H., Glaser, B., Suarez, B. K., and Permutt, M. A. (2004): A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. *Diabetes* **53**, 1134-40.
- Luc, G., Bard, J. M., Ferrieres, J., Evans, A., Amouyel, P., Arveiler, D., Fruchart, J. C., and Ducimetiere, P. (2002): Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1155-61.
- Luo, J., Field, S. J., Lee, J. Y., Engelman, J. A., and Cantley, L. C. (2005): The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *J Cell Biol* **170**, 455-64.
- Luque-Ramirez, M., San Millan, J. L., and Escobar-Morreale, H. F. (2006): Genomic variants in polycystic ovary syndrome. *Clin Chim Acta* **366**, 14-26.

- Luu-The, V., Dufort, I., Pelletier, G., and Labrie, F. (2001): Type 5 β -hydroxysteroid dehydrogenase: its role in the formation of androgens in women. *Mol Cell Endocrinol* **171**, 77-82.
- Maddux, B. A., and Goldfine, I. D. (2000): Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor α -subunit. *Diabetes* **49**, 13-9.
- Magoffin, D. A. (2005): Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1344-9.
- Maitra, A., Pingle, R. R., Menon, P. S., Naik, V., Gokral, J. S., and Meherji, P. K. (2001): Dyslipidemia with particular regard to apolipoprotein profile in association with polycystic ovary syndrome: a study among Indian women. *Int J Fertil Womens Med* **46**, 271-7.
- Marsden, P. J., Murdoch, A. P., and Taylor, R. (2001): Tissue insulin sensitivity and body weight in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **55**, 191-9.
- Marszalek, B., Lacinski, M., Babych, N., Capla, E., Biernacka-Lukanty, J., Warenik-Szymankiewicz, A., and Trzeciak, W. H. (2001): Investigations on the genetic polymorphism in the region of CYP17 gene encoding 5'-UTR in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* **15**, 123-8.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., and Flier, J. S. (2001): A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* **294**, 2166-70.
- Masuzaki, H., Yamamoto, H., Kenyon, C. J., Elmquist, J. K., Morton, N. M., Paterson, J. M., Shinyama, H., Sharp, M. G., Fleming, S., Mullins, J. J., Seckl, J. R., and Flier, J. S. (2003): Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest* **112**, 83-90.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., and Turner, R. C. (1985): Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-9.
- McGee, E. A., Sawetawan, C., Bird, I., Rainey, W. E., and Carr, B. R. (1996): The effect of insulin and insulin-like growth factors on the expression of steroidogenic enzymes in a human ovarian thecal-like tumor cell model. *Fertil Steril* **65**, 87-93.
- Mesiano, S., Katz, S. L., Lee, J. Y., and Jaffe, R. B. (1997): Insulin-like growth factors augment steroid production and expression of steroidogenic enzymes in human fetal adrenal cortical cells: implications for adrenal androgen regulation. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1390-6.
- Meyre, D., Bouatia-Naji, N., Tounian, A., Samson, C., Lecoeur, C., Vatin, V., Ghoussaini, M., Wachter, C., Hercberg, S., Charpentier, G., Patsch, W., Pattou, F., Charles, M. A., Tounian, P., Clement, K., Jouret, B., Weill, J., Maddux, B. A., Goldfine, I. D., Walley, A., Boutin, P., Dina, C., and Froguel, P. (2005): Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat Genet* **37**, 863-7.
- Michelmores, K. F., Balen, A. H., Dunger, D. B., and Vessey, M. P. (1999): Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in young women. *Clin Endocrinol (Oxf)* **51**, 779-86.
- Michelmores, K., Ong, K., Mason, S., Bennett, S., Perry, L., Vessey, M., Balen, A., and Dunger, D. (2001): Clinical features in women with polycystic ovaries: relationships to insulin sensitivity, insulin gene VNTR and birth weight. *Clin Endocrinol (Oxf)* **55**, 439-46.
- Mifsud, A., Ramirez, S., and Yong, E. L. (2000): Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3484-8.
- Miklos, G. L., and Maleszka, R. (2004): Microarray reality checks in the context of a complex disease. *Nat Biotechnol* **22**, 615-21.
- Miller, W. L. (2002): Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol* **198**, 7-14.
- Mok, A., Cao, H., Zinman, B., Hanley, A. J., Harris, S. B., Kennedy, B. P., and Hegele, R. A. (2002): A single nucleotide polymorphism in protein tyrosine phosphatase PTP-1B is associated with protection from diabetes or impaired glucose tolerance in Oji-Cree. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 724-7.
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., and Groop, L. C. (2003): PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**, 267-73.
- Moran, C., and Azziz, R. (2001): The role of the adrenal cortex in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* **28**, 63-75.

- Munir, I., Yen, H. W., Baruth, T., Tarkowski, R., Azziz, R., Magoffin, D. A., and Jakimiuk, A. J. (2005): Resistin stimulation of 17 α -hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 4852-7.
- Nadon, R., and Shoemaker, J. (2002): Statistical issues with microarrays: processing and analysis. *Trends Genet* **18**, 265-71.
- Natarajan, R., and Nadler, J. L. (2004): Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1542-8.
- Nelson, V. L., Legro, R. S., Strauss, J. F., 3rd, and McAllister, J. M. (1999): Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* **13**, 946-57.
- Nelson, V. L., Qin Kn, K. N., Rosenfield, R. L., Wood, J. R., Penning, T. M., Legro, R. S., Strauss, J. F., 3rd, and McAllister, J. M. (2001): The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5925-33.
- Nestler, J. E., Powers, L. P., Matt, D. W., Steingold, K. A., Plymate, S. R., Rittmaster, R. S., Clore, J. N., and Blackard, W. G. (1991): A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **72**, 83-9.
- Nestler, J. E., Jakubowicz, D. J., de Vargas, A. F., Brik, C., Quintero, N., and Medina, F. (1998): Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2001-5.
- Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., and Akiyama, T. (2004): DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* **23**, 8520-6.
- Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2003): Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* **374**, 337-48.
- Nishizuka, S., Charboneau, L., Young, L., Major, S., Reinhold, W. C., Waltham, M., Kouros-Mehr, H., Bussey, K. J., Lee, J. K., Espina, V., Munson, P. J., Petricoin, E., 3rd, Liotta, L. A., and Weinstein, J. N. (2003): Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14229-34.
- Norman, R. J., Masters, S., and Hague, W. (1996): Hyperinsulinemia is common in family members of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **66**, 942-7.
- Norman, R. J., Masters, L., Milner, C. R., Wang, J. X., and Davies, M. J. (2001a): Relative risk of conversion from normoglycaemia to impaired glucose tolerance or non-insulin dependent diabetes mellitus in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* **16**, 1995-8.
- Norman, R. J., Milner, C. R., Groome, N. P., and Robertson, D. M. (2001b): Circulating follistatin concentrations are higher and activin concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* **16**, 668-72.
- Norman, R. J., Davies, M. J., Lord, J., and Moran, L. J. (2002): The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 251-7.
- Ntambi, J. M., and Miyazaki, M. (2003): Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Curr Opin Lipidol* **14**, 255-61.
- Ober, C., Weil, S., Steck, T., Billstrand, C., Levrant, S., and Barnes, R. (1992): Increased risk for polycystic ovary syndrome associated with human leukocyte antigen DQA1*0501. *Am J Obstet Gynecol* **167**, 1803-6.
- Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I., and Young, R. A. (2004): Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**, 1378-81.
- Oksanen, L., Tiitinen, A., Kaprio, J., Koistinen, H. A., Karonen, S., and Kontula, K. (2000): No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor genes in women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* **6**, 873-6.
- Olsson, I., Larsson, K., Palmgren, R., and Bjellqvist, B. (2002): Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics* **2**, 1630-2.

- Orio, F., Jr., Matarese, G., Di Biase, S., Palomba, S., Labella, D., Sanna, V., Savastano, S., Zullo, F., Colao, A., and Lombardi, G. (2003): Exon 6 and 2 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5887-92.
- Park, P. J., Butte, A. J., and Kohane, I. S. (2002): Comparing expression profiles of genes with similar promoter regions. *Bioinformatics* **18**, 1576-84.
- Patti, M. E., Butte, A. J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E. J., Goldfine, A. B., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C. R., and Mandarino, L. J. (2003): Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8466-71.
- Pigny, P., Cortet-Rudelli, C., Decanter, C., Deroubaix, D., Soudan, B., Duhamel, A., and Dewailly, D. (2000): Serum levels of inhibins are differentially altered in patients with polycystic ovary syndrome: effects of being overweight and relevance to hyperandrogenism. *Fertil Steril* **73**, 972-7.
- Pigny, P., Merlen, E., Robert, Y., Cortet-Rudelli, C., Decanter, C., Jonard, S., and Dewailly, D. (2003): Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5957-62.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A. F. (2003): The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* **66**, 1499-503.
- Qin, K. N., and Rosenfield, R. L. (1998): Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* **145**, 111-21.
- Quinkler, M., Sinha, B., Tomlinson, J. W., Bujalska, I. J., Stewart, P. M., and Arlt, W. (2004): Androgen generation in adipose tissue in women with simple obesity--a site-specific role for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *J Endocrinol* **183**, 331-42.
- Rahman, S. M., Dobrzyn, A., Dobrzyn, P., Lee, S. H., Miyazaki, M., and Ntambi, J. M. (2003): Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11110-5.
- Rahman, S. M., Dobrzyn, A., Lee, S. H., Dobrzyn, P., Miyazaki, M., and Ntambi, J. M. (2005): Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases insulin signaling and glycogen accumulation in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E381-7.
- Rajkhowa, M., Neary, R. H., Kumpatla, P., Game, F. L., Jones, P. W., Obhrai, M. S., and Clayton, R. N. (1997): Altered composition of high density lipoproteins in women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 3389-94.
- Reaven, G. (2002): Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* **106**, 286-8.
- Reaven, G. M. (2005): The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem* **51**, 931-8.
- Reed, M. J., Meszaros, K., Entes, L. J., Claypool, M. D., Pinkett, J. G., Brignetti, D., Luo, J., Khandwala, A., and Reaven, G. M. (1999): Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* **42**, 102-6.
- Richards, J. S. (2001): New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* **15**, 209-18.
- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K., and Sharma, S. C. (2002): Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* **57**, 195-220.
- Robinson, S., Henderson, A. D., Gelding, S. V., Kiddy, D., Niththyananthan, R., Bush, A., Richmond, W., Johnston, D. G., and Franks, S. (1996): Dyslipidaemia is associated with insulin resistance in women with polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf)* **44**, 277-84.
- Rodin, A., Thakkar, H., Taylor, N., and Clayton, R. (1994): Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. Evidence of dysregulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *N Engl J Med* **330**, 460-5.
- Roldan, B., San Millan, J. L., and Escobar-Morreale, H. F. (2004): Genetic basis of metabolic abnormalities in polycystic ovary syndrome: implications for therapy. *Am J Pharmacogenomics* **4**, 93-107.
- Rosenbaum, D., Haber, R. S., and Dunaif, A. (1993): Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol* **264**, E197-202.
- Rosenfield, R. L. (1999): Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **28**, 265-93.

- Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., and MacDougald, O. A. (2000): Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* **289**, 950-3.
- Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Hemi, R., Kanety, H., and Bashan, N. (1998): Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **47**, 1562-9.
- Rushmore, T. H., Morton, M. R., and Pickett, C. B. (1991): The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* **266**, 11632-9.
- Sabuncu, T., Vural, H., Harma, M., and Harma, M. (2001): Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem* **34**, 407-13.
- Salehi, M., Bravo-Vera, R., Sheikh, A., Gouller, A., and Poretsky, L. (2004): Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: what is the role of obesity? *Metabolism* **53**, 358-76.
- Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001): Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.
- Saltiel, A. R., and Pessin, J. E. (2003): Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* **4**, 711-6.
- Sam, S., and Dunaif, A. (2003): Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab* **14**, 365-70.
- San Millan, J. L., Corton, M., Villuendas, G., Sancho, J., Peral, B., and Escobar-Morreale, H. F. (2004): Association of the polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2640-6.
- San Millan, J. L., Botella-Carretero, J. I., Alvarez-Blasco, F., Luque-Ramirez, M., Sancho, J., Moghetti, P., and Escobar-Morreale, H. F. (2005): A Study of the Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene R453Q and 11{beta}-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Gene 83557insA Polymorphisms in the Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 4157-4162.
- Sanchez, J. C., Chiappe, D., Converset, V., Hoogland, C., Binz, P. A., Paesano, S., Appel, R. D., Wang, S., Sennitt, M., Nolan, A., Cawthorne, M. A., and Hochstrasser, D. F. (2001): The mouse SWISS-2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity. *Proteomics* **1**, 136-63.
- Sawetawan, C., Carr, B. R., McGee, E., Bird, I. M., Hong, T. L., and Rainey, W. E. (1996): Inhibin and activin differentially regulate androgen production and 17 alpha-hydroxylase expression in human ovarian thecal-like tumor cells. *J Endocrinol* **148**, 213-21.
- Schwartz, D. R., Wu, R., Kardia, S. L., Levin, A. M., Huang, C. C., Shedden, K. A., Kuick, R., Misek, D. E., Hanash, S. M., Taylor, J. M., Reed, H., Hendrix, N., Zhai, Y., Fearon, E. R., and Cho, K. R. (2003): Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* **63**, 2913-22.
- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2000): Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *Faseb J* **14**, 1345-51.
- Seow, K. M., Juan, C. C., Wu, L. Y., Hsu, Y. P., Yang, W. M., Tsai, Y. L., Hwang, J. L., and Ho, L. T. (2004): Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. *Hum Reprod* **19**, 48-53.
- Shen, Z. J., Chen, X. P., and Chen, Y. G. (2005): Inhibin B, activin A, and follistatin and the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* **88**, 336-7.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-8.
- Siegel, S., Futterweit, W., Davies, T. F., Concepcion, E. S., Greenberg, D. A., Villanueva, R., and Tomer, Y. (2002): A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **78**, 1240-3.
- Singh, R., Artaza, J. N., Taylor, W. E., Braga, M., Yuan, X., Gonzalez-Cadavid, N. F., and Bhasin, S. (2005): Testosterone Inhibits Adipogenic Differentiation in 3T3-L1 Cells: Nuclear Translocation of Androgen Receptor Complex with {beta}-Catenin and TCF4 may Bypass Canonical Wnt Signaling to Downregulate Adipogenic Transcription Factors. *Endocrinology*.
- Smith, G. W., Gentry, P. C., Bao, B., Long, D. K., Roberts, R. M., and Smith, M. F. (1997): Control of extracellular matrix remodelling within ovarian tissues: localization and regulation of gene expression of plasminogen activator inhibitor type-1 within the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* **110**, 107-14.
- Smits, J., Cortvriendt, R., Hu, Y., and Vanderstichele, H. (1998): Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev* **50**, 294-304.

- Spranger, J., Mohlig, M., Wegewitz, U., Ristow, M., Pfeiffer, A. F., Schill, T., Schlosser, H. W., Brabant, G., and Schofl, C. (2004): Adiponectin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **61**, 738-46.
- Starka, L., Duskova, M., Cermakova, I., Vrbikova, J., and Hill, M. (2005): Premature androgenic alopecia and insulin resistance. Male equivalent of polycystic ovary syndrome? *Endocr Regul* **39**, 127-31.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2001): The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-12.
- Strowitzki, T., Halser, B., and Demant, T. (2002): Body fat distribution, insulin sensitivity, ovarian dysfunction and serum lipoproteins in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* **16**, 45-51.
- Stumvoll, M., Tschrirter, O., Fritsche, A., Staiger, H., Renn, W., Weisser, M., Machicao, F., and Haring, H. (2002): Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 37-41.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005): Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-50.
- Techatraisak, K., Conway, G. S., and Rumsby, G. (1997): Frequency of a polymorphism in the regulatory region of the 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) gene in hyperandrogenic states. *Clin Endocrinol (Oxf)* **46**, 131-4.
- Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoura, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Nakajima, H., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Sekihara, H., Yin, Y., Barrett, J. C., Oda, H., Ishikawa, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Suzuki, M., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H., Kadowaki, T., and *et al.* (1999): Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet* **21**, 230-5.
- Tian, Q., Stepaniants, S. B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M. C., Doyle, M. J., Yi, E. C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J. P., Gunter, B., Linseley, P. S., Stoughton, R. B., Aebersold, R., Collins, S. J., Hanlon, W. A., and Hood, L. E. (2004): Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* **3**, 960-9.
- Tirosch, A., Potashnik, R., Bashan, N., and Rudich, A. (1999): Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **274**, 10595-602.
- Tomlinson, J. W., and Stewart, P. M. (2004): "Cushing's disease of the omentum"--fact or fiction? *J Endocrinol Invest* **27**, 171-4.
- Tsilchorozidou, T., Honour, J. W., and Conway, G. S. (2003): Altered cortisol metabolism in polycystic ovary syndrome: insulin enhances 5alpha-reduction but not the elevated adrenal steroid production rates. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5907-13.
- Tsilchorozidou, T., Overton, C., and Conway, G. S. (2004): The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **60**, 1-17.
- Tucci, S., Futterweit, W., Concepcion, E. S., Greenberg, D. A., Villanueva, R., Davies, T. F., and Tomer, Y. (2001): Evidence for association of polycystic ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 446-9.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001): Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5116-21.
- Ueki, K., Fruman, D. A., Brachmann, S. M., Tseng, Y. H., Cantley, L. C., and Kahn, C. R. (2002): Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol* **22**, 965-77.
- Ueki, K., Fruman, D. A., Yballe, C. M., Fasshauer, M., Klein, J., Asano, T., Cantley, L. C., and Kahn, C. R. (2003): Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem* **278**, 48453-66.
- Urbanek, M., Legro, R. S., Driscoll, D. A., Azziz, R., Ehrmann, D. A., Norman, R. J., Strauss, J. F., 3rd, Spielman, R. S., and Dunaif, A. (1999): Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8573-8.

- Urbanek, M., Legro, R. S., Driscoll, D., Strauss, J. F., 3rd, Dunaif, A., and Spielman, R. S. (2000): Searching for the polycystic ovary syndrome genes. *J Pediatr Endocrinol Metab* **13 Suppl 5**, 1311-3.
- Urbanek, M., Du, Y., Silander, K., Collins, F. S., Steppan, C. M., Strauss, J. F., 3rd, Dunaif, A., Spielman, R. S., and Legro, R. S. (2003): Variation in resistin gene promoter not associated with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **52**, 214-7.
- Urbanek, M., Woodroffe, A., Ewens, K. G., Diamanti-Kandarakis, E., Legro, R. S., Strauss, J. F., 3rd, Dunaif, A., and Spielman, R. S. (2005): Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 6623-9.
- Vankova, M., Vrbikova, J., Hill, M., Cinek, O., and Bendlova, B. (2002): Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 558-65.
- Venkatesan, A. M., Dunaif, A., and Corbould, A. (2001): Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res* **56**, 295-308.
- Villuendas, G., Botella-Carretero, J. I., Roldan, B., Sancho, J., Escobar-Morreale, H. F., and San Millan, J. L. (2005): Polymorphisms in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene and the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene influence glucose homeostasis and body mass index in women with polycystic ovary syndrome and non-hyperandrogenic controls. *Hum Reprod* **20**, 3184-91.
- Vincent, S., and Settleman, J. (1997): The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol* **17**, 2247-56.
- Voutilainen, R., Tapanainen, J., Chung, B. C., Matteson, K. J., and Miller, W. L. (1986): Hormonal regulation of P450_{scc} (20,22-desmolase) and P450_{c17} (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* **63**, 202-7.
- Wake, D. J., and Walker, B. R. (2004): 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* **215**, 45-54.
- Walch, K., Grimm, C., Huber, J. C., Nagele, F., Kolbus, A., and Hefler, L. A. (2005): A polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and the polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **123**, 77-81.
- Waldstreicher, J., Santoro, N. F., Hall, J. E., Filicori, M., and Crowley, W. F., Jr. (1988): Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* **66**, 165-72.
- Wasko, R., Komarowska, H., Warenik-Szymankiewicz, A., and Sowinski, J. (2004): Elevated ghrelin plasma levels in patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Metab Res* **36**, 170-3.
- Waterworth, D. M., Bennett, S. T., Gharani, N., McCarthy, M. I., Hague, S., Batty, S., Conway, G. S., White, D., Todd, J. A., Franks, S., and Williamson, R. (1997): Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* **349**, 986-90.
- Watson, R. T., Kanzaki, M., and Pessin, J. E. (2004): Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev* **25**, 177-204.
- Wickenheisser, J. K., Quinn, P. G., Nelson, V. L., Legro, R. S., Strauss, J. F., 3rd, and McAllister, J. M. (2000): Differential activity of the cytochrome P450 17alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2304-11.
- Williams, L. B., Fawcett, R. L., Waechter, A. S., Zhang, P., Kogon, B. E., Jones, R., Inman, M., Huse, J., and Considine, R. V. (2000): Leptin production in adipocytes from morbidly obese subjects: stimulation by dexamethasone, inhibition with troglitazone, and influence of gender. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2678-84.
- Willis, D., Mason, H., Gilling-Smith, C., and Franks, S. (1996): Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 302-9.
- Witchel, S. F., Lee, P. A., Suda-Hartman, M., and Hoffman, E. P. (1997): Hyperandrogenism and manifesting heterozygotes for 21-hydroxylase deficiency. *Biochem Mol Med* **62**, 151-8.
- Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E., and Stoffel, M. (2003): Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11624-9.
- Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J. M., and Stoffel, M. (2004): Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* **432**, 1027-32.

- Wood, J. R., Nelson, V. L., Ho, C., Jansen, E., Wang, C. Y., Urbanek, M., McAllister, J. M., Mosselman, S., and Strauss, J. F., 3rd (2003): The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem* **278**, 26380-90.
- Wu, X., Sallinen, K., Anttila, L., Makinen, M., Luo, C., Pollanen, P., and Erkkola, R. (2000): Expression of insulin-receptor substrate-1 and -2 in ovaries from women with insulin resistance and from controls. *Fertil Steril* **74**, 564-72.
- Wu, X. K., Zhou, S. Y., Liu, J. X., Pollanen, P., Sallinen, K., Makinen, M., and Erkkola, R. (2003): Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **80**, 954-65.
- Xita, N., Georgiou, I., Chatzikiyriakidou, A., Vounatsou, M., Papassotiriou, G. P., Papassotiriou, I., and Tsatsoulis, A. (2005): Effect of adiponectin gene polymorphisms on circulating adiponectin and insulin resistance indexes in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Chem* **51**, 416-23.
- Yilmaz, M., Biri, A., Bukan, N., Karakoc, A., Sancak, B., Toruner, F., and Pasaoglu, H. (2005a): Levels of lipoprotein and homocysteine in non-obese and obese patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* **20**, 258-63.
- Yilmaz, M., Bukan, N., Ayvaz, G., Karakoc, A., Toruner, F., Cakir, N., and Arslan, M. (2005b): The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* **20**, 3333-40.
- Zachow, R. J., and Magoffin, D. A. (1997): Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **138**, 847-50.
- Zawadzki, J. K., Dunaif, A. (1992): Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: Towards a rational approach, pp. 377-384. In A. In: Dunaif, Givens, J.R., Haseltine, F.P., Merriam GR, Eds. Polycystic ovary syndrome (series Ed: Hershman, S.M.) (Ed.): *Current issues in Endocrinology and Metabolism*, Blackwell Scientific Publications, Boston.
- Zhang, L. H., Rodriguez, H., Ohno, S., and Miller, W. L. (1995): Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10619-23.
- Zimmermann, N., King, N. E., Laporte, J., Yang, M., Mishra, A., Pope, S. M., Muntel, E. E., Witte, D. P., Pegg, A. A., Foster, P. S., Hamid, Q., and Rothenberg, M. E. (2003): Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* **111**, 1863-74.

PUBLICACIONES

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. **Corton, M.**, Villuendas, G., Botella, J. I., San Millan, J. L., Escobar-Morreale, H. F., and Peral, B. (2004): Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* **4**, 438-41. (Corton *et al.*, 2004)
2. San Millan, J. L., **Corton, M.**, Villuendas, G., Sancho, J., Peral, B., and Escobar-Morreale, H. F. (2004): Association of the polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2640-6.
3. **Corton, M.**, Botella-Carretero, J. I., Benguria, A., Villuendas, G., Zaballos, A., San Millan, J. L., Escobar-Morreale, H. F., and Peral, B. (2006): Differential Gene Expression Profile in Omental Adipose Tissue in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*.

Del trabajo descrito en esta memoria, la parte de la puesta a punto del proteoma del tejido adiposo queda recogido en la primera reseña y el estudio de asociación de variantes alélicas al PCOS queda recogido en el segundo artículo. El tercer artículo, que recoge el estudio de la expresión diferencial de genes en el tejido adiposo en pacientes con PCOS, está aceptado y ha sido publicado en Internet de forma previa a su publicación en prensa.

En el momento de entrega de esta Tesis Doctoral, un cuarto artículo, que describe el estudio de proteómica diferencial, se encuentra sometido para su publicación en el *Journal of Proteome Research*: **Cortón M**, Botella-Carretero JI, Villuendas G, López JA, Camafeita E, San Millán JL, Escobar-Morreale HF, and Peral P. Proteomic Analysis of Human Omental Adipose Tissue in the Polycystic Ovary Syndrome and Obesity Using 2-D DIGE and MS.

A continuación, se adjuntan los tres artículos publicados.

Short Communication

Marta Cortón¹
Gemma Villuendas²
José I. Botella²
José L. San Millán²
Héctor F. Escobar-Morreale²
Belén Peral¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC UAM, Madrid, Spain

²Department of Molecular Genetics and Department of Endocrinology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide

Polycystic ovary syndrome is a very common disease affecting 6.5% of women. It is frequently associated with obesity with the link between the two disorders being insulin resistance. From morbidly obese women submitted to surgical treatment of obesity, we obtain intra-abdominal adipose tissue samples in order to compare protein patterns between women with and without polycystic ovary syndrome by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) analysis. Adipose tissue is a complex material extremely rich in lipids. To improve protein solubilization a lysis buffer containing 8.4 M urea, 2.4 M thiourea, 5% 3-((3-cholamidopropyl)dimethyl-amino)-1-propanesulfonate and 50 mM dithiothreitol was used and samples were centrifuged to remove fat. Hydroxyethyl disulfide was added to increase resolution in the alkaline region (Olsson, I., Larsson, K., Palmgren, R., Bjellqvist, B., *Proteomics* 2002, 2, 1630–1632) and it also improved resolution in a wide pH range (3–10). Our work shows for the first time 2-DE maps of human adipose tissue and identifies some of the proteins by mass spectrometry. This information will aid studies on metabolic diseases such as polycystic ovary syndrome, obesity, hypertension and type 2 diabetes.

Keywords: Alkaline pH gradient / Broad pH gradient / Human adipose tissue / Two-dimensional gel electrophoresis
PRO 0644

Proteomics could be described as the global analysis of gene expression at the protein level from a whole organism, cell culture or a tissue. The combined use of 2-DE and MS is the method of choice for characterization of complex samples. Recent technical improvements related to 2-DE and MS have resulted in increased sensitivity, reproducibility and throughput of proteome analysis thereby providing an established technological platform [1]. However, additional improvements are needed for the analysis of specific proteins such as low-abundant, high molecular weight or highly hydrophobic species. On the other hand, while wide range pH gradients and ultra-zoom gels appear to work properly below pH 7, obtaining a comparable resolution in the alkaline pH region is not straightforward [2–4]. Moreover, samples such as serum, cerebrospinal fluid or adipose tissue are especially difficult to study [5].

Correspondence: Dr. Belén Peral, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM, Arturo Duperier, 4. E-28029 Madrid, Spain
E-mail: bperal@iib.uam.es
Fax: +34-91-585-44-01

Abbreviation: HED, Hydroxyethyl disulfide

The biochemistry of adipose tissue is of great interest, given that the prevalence of obesity is increasing exponentially in developed countries, and obesity plays an important role in the development of type 2 diabetes, dyslipidemia, polycystic ovary syndrome (PCOS) and cardiovascular diseases [6]. Therefore, obesity research focuses on the identification of regulatory systems and potential targets for drug development. Such targets could be found among the genes and proteins expressed in adipose tissue. Until recently, adipose tissue was considered to play a passive role in the body acting merely as a storage depot for fat; however, adipocytes are actively involved in maintaining the energy balance of the body, and participate in processes such as satiety, bone function and reproduction. Most of these functions are carried out *via* proteins secreted by cells from adipose tissue. They are capable of acting locally or in other nonadipose tissues such as muscle, liver and stomach. Furthermore, these proteins have been described to function in the nervous, immune and vascular systems and even play a role in bone turnover [7]. We were interested in fully understanding the physiological functions of intra-abdominal adipose tissue in pathologies related to insulin resistance such as obesity and PCOS, and in addressing whether there are differentially expressed proteins in the adipose

tissue of obese women with and without PCOS. In this preliminary work we have optimized a protocol for IEF with IPGs 3–10 and 6–11 strips for samples from human intra-abdominal adipose tissue and we have identified some proteins by MALDI-TOF MS.

Samples were obtained from morbidly obese women submitted to surgical treatment for obesity. Samples (from ten unaffected women) were cut into small pieces and frozen at -75°C until needed. Homogenization was performed using a Polytron PT-1200C (Kinematica, Luzern, Switzerland) directly in the lysis buffer (8.4 M urea, 2.4 M thiourea, 5% CHAPS, 50 mM DTT and 1% IPG buffer 3–10 (total volume 2 mL/g fat pad)). Rabilloud *et al.* [8] reported that thiourea in combination with urea increases the solubility of proteins in IPGs and increases the number of proteins visualized in the second dimension. To improve lysis and protein solubilization, the suspension was gently shaken for 60 min at room temperature, then centrifuged at 70 000 rpm for 1.5 h at 19°C using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA). When attempting to solubilize and separate proteins from abdominal omental adipose tissue, some difficulties arose due to the presence of large amounts (often $> 50\%$ of the tissue volume) of triglycerides. To circumvent this difficulty, the soluble infranatant, below the fat supernatant, was carefully recovered, avoiding the unhomogenized material at the bottom of the centrifuge tube. The protein concentration in the collected fraction was measured according to the Bradford dye-binding procedure [9]. The original protein extract was diluted in rehydration solution containing 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer, 0.002% bromophenol blue and 10 mM DTT (depending on the gel 50 mM DTT or 100 mM hydroxyethyl disulfide (HED) was sometimes used in place of 10 mM DTT) before IEF. For IPG 6–11, 100 μg of protein diluted in 100 μL of rehydration solution was applied by cup-loading close to the anode [1]. For IPG 3–10, 80 μg of protein was applied by in-gel sample rehydration [10, 11] in 350 μL of the

above solution. The experiments were performed in duplicate for each condition and pH range. The strips (18 cm) were focused at 0.05 mA/IPG strip in the IPGphor IEF System (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The running conditions for IPG 6–11 were: 0–300 V in 1 min, 300 V for 3 h, from 300–600 V in 2 h, from 600–1000 V in 2 h, from 1000–8000 V in 3 h, and 8000 V for 5 h. The running conditions for IPG strips 3–10 were those reported by Görg *et al.* [1], with minor modifications, including an additional step at 120 V for 1 h, and a 90 min ramp from 1000–8000 V, instead of a 30 min ramp. The step at 8000 V was maintained until 35 kVh was reached. After IEF, the strips (pH 6–11 and 3–10) were equilibrated and SDS-PAGE was performed using a Protean II XL system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Gels (12.5%) in a $185 \times 200 \times 1$ mm format were fixed overnight and silver stained.

Horizontal streaking in the alkaline region of 2-DE maps is often observed. This streaking is due to (i) the loss of reducing agent in the basic part of the IPG strip, together with oxidation of protein thiol groups [1] and (ii) water transport to the anode due to a reverse electroendosmotic flow [2]. To circumvent the first problem, some investigators introduce a paper wick immersed in DTT at the cathode during focusing to alleviate the loss of DTT in the basic region [3, 12]. To prevent water transport, addition of 10% isopropanol [2] or an isopropanol/glycerol mixture to the rehydration solution has been proposed as a solution [3]. Other investigators have simplified the procedure for analysing very alkaline proteins by decreasing the total focusing time to a minimum (*i.e.* increasing the voltage to 8000 V to shorten the time required to reach steady state) [4, 13].

For samples from human abdominal omental adipose tissue, replacing DTT by HED (DeStreak Reagent; Amersham Biosciences) in the rehydration and sample solution when using Immobiline DryStrips 6–11, improved separation efficiency (Fig. 1). This confirmed the findings

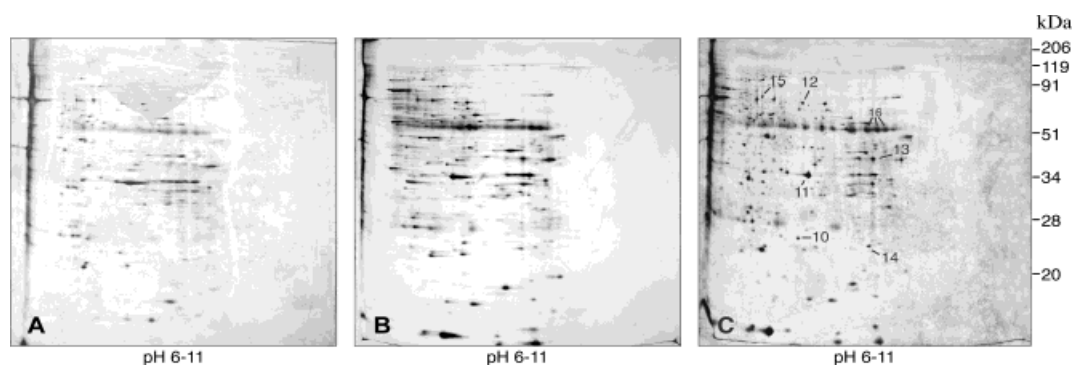


Figure 1. Two-dimensional gels (pH 6–11) of human intra-abdominal adipose tissue (100 μg) focused with 10 mM DTT (A), 50 mM DTT (B) or 100 mM HED (C) in the rehydration and sample solutions. The indicated spots were picked and digested for protein identification (Table 1).

of Olsson and coworkers who showed that HED eliminated horizontal streaking and simplified the spot patterns in the basic gradient [14]. Figure 1 shows that horizontal streaking along with numerous spot trains disappeared when HED was employed instead of DTT. More proteins can be visualized, since the intensity and number of spots increased. The majority of these spots are better defined and smaller. Moreover, the 2-DE map in Fig. 1C is better focused compared to the maps in Figs. 1A and B. HED quantitatively oxidizes protein thiol groups to disulfide yielding a single protein species without any unwanted side reactions, thereby improving gel reproducibility [14].

As shown in Fig. 2, 2-DE maps are notably improved when HED is added to the rehydration solution of wide IPG 3–10 strips. In this case in-gel sample rehydration [10, 11] was employed instead of cup-loading, as in our hands the former performs better in the pH 3–10 range; however, the resulting spot patterns were comparable (data not shown). Serum albumin is the most abundant protein in adipose tissue (spot 1 in Fig. 2). Even though 2-DE gels easily become overloaded with this protein, the protocol used to optimize IEF for adipose tissue greatly enhanced the focusing of serum albumin. In the rehydration solution for both IPG 3–10 and 6–11 strips, HED concentrations other than 100 mM (*i.e.* 50 mM and 200 mM) were also tested. The three conditions led to very similar spot patterns (data not shown).

The use of PDQuest software (Bio-Rad) to detect spots in the gel images was performed according to the manufacturer's instructions. For IPG 3–10 strips, the program detected 110 and 123 additional spots when HED was added to the rehydration solution instead of 10 mM DTT

and 50 mM DTT, respectively, using the same spot detection parameters. For IPG 6–11 strips only the map shown in Fig. 1C was analyzed with PDQuest software. From this analyses 488 spots were detected.

Spots of interest were excised from the gel and submitted to tryptic digestion according to a protocol based on that from Shevchenko *et al.* [15] with minor variations. The resulting digestion solutions were collected and spotted on a 400 mm AnchorChip MALDI probe (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) together with the appropriate matrix solution and allowed to dry at room temperature. Samples were measured on a Bruker Reflex IV MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker-Daltonics) in positive ion reflector mode. Mass measurements were performed automatically under the control of a fuzzy logic engine. Each spectrum was internally calibrated with the masses of two trypsin autolysis products at $m/z = 842.510$ and $m/z = 2211.105$ to reach a typical mass measurement accuracy of ± 30 ppm. The measured tryptic peptide masses were transferred, using the MS BioTools program (Bruker-Daltonics), as inputs to search the NCBI nr database (www.ncbi.nlm.nih.gov) using Mascot software (MatrixScience, London, UK). No restrictions were placed on the species of origin of the protein and no variable modifications were allowed. Up to one missed tryptic cleavage was considered and a mass accuracy of 50 ppm was used for all tryptic mass searches. Some of the identified proteins are listed in Table 1.

Several 2-DE maps of mouse white adipose tissue proteins have been reported [5, 16], while related proteomic approaches have been applied to human cultured preadipocytes and adipocytes exclusively [17]. In this study, we have optimized the sample preparation procedure for the

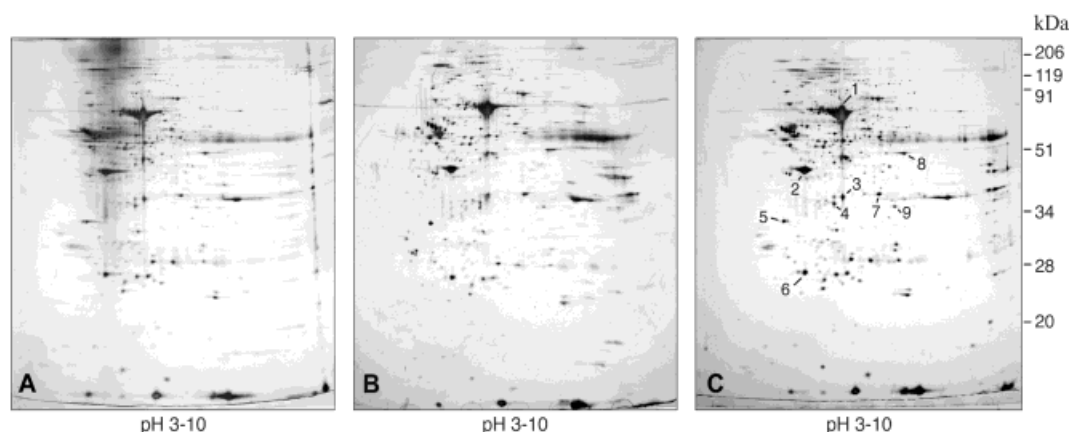


Figure 2. Protein pattern (pH 3–10) from human intra-abdominal adipose tissue (80 µg) focused with 10 mM DTT (A), 50 mM DTT (B) or 100 mM HED (C) in the rehydration solution. The indicated spots were picked and digested for protein identification (Table 1).

Table 1. Proteins identified by MALDI peptide mapping of spots indicated in Figs. 1 and 2

Spot no.	Protein identity	Accession no.	Theoretical M_r (Da)	Theoretical pI
1	Human serum albumin	gi 4389275	67 988	5.69
2	Actin, gamma 1 propeptide	gi 4501887	42 108	5.31
3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	gi 21594877	38 171	5.81
4	Lactate dehydrogenase B	gi 4557032	36 900	5.71
5	Annexin V	gi 17391477	35 959	4.94
6	Apolipoprotein A1 precursor	gi 4557321	30 759	5.56
7	Annexin I	gi 4502101	38 918	7.57
8	Enolase 1	gi 4503571	47 481	7.01
9	Cytosolic malate dehydrogenase	gi 5174539	36 631	6.91
10	Biliverdin reductase B	gi 544759	21 960	7.31
11	Annexin A2	gi 16306978	38 822	7.57
12	Transketolase	gi 4507521	68 519	7.58
13	Aldolase A	gi 229674	39 720	8.39
14	Peroxiredoxin 1	gi 4505591	22 324	8.27
15	Long-chain fatty-acid-Coenzyme A ligase 2	gi 11276083	78 919	6.81
16	Immunoglobulin heavy chain gamma	gi 2765425	53 379	8.74

proteomic analysis of human intra-abdominal adipose tissue using two different IPG strips and extended the analyzed region to include the alkaline range.

The authors wish to thank Dr. J. A. López and Dr. E. Camafeita for helpful discussions and technical advice. We are also indebted to the patients and doctors who have contributed to this project. This work was supported by Grants from the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (projects FIS PI02/0578 and PI02/0741) and from the Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RCMN (C03/08) and Red de Grupos RGDM (G03/212), Madrid, Spain.

Received April 30, 2003

Revised August 13, 2003

Accepted September 5, 2003

References

- [1] Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A. *et al.*, *Electrophoresis* 2000, **21**, 1037–1053.
- [2] Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A. *et al.*, *Electrophoresis* 1997, **18**, 328–337.
- [3] Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Müller, D. *et al.*, *Proteomics* 2002, **2**, 127–134.
- [4] Wildgruber, R., Reil, G., Drews, O., Parlar, H. *et al.*, *Proteomics* 2002, **2**, 727–732.
- [5] Lanne, B., Potthast, F., Höglund, A., Brockenhuus von Löwenhielm, H. *et al.*, *Proteomics* 2001, **1**, 819–828.
- [6] Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Hirsch, J., *N. Engl. J. Med.* 1997, **337**(6), 396–407.
- [7] Spiegelman, B., Flier, J. S., *Cell* 2001, **104**, 531–543.
- [8] Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J., *Electrophoresis* 1997, **18**, 307–316.
- [9] Bradford, M., *Anal. Biochem.* 1976, **72**, 248–254.
- [10] Rabilloud, T., Valette, C., Lawrence, J. J., *Electrophoresis* 1994, **15**, 1552–1558.
- [11] Sanchez, J.-C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F. *et al.*, *Electrophoresis* 1997, **18**, 324–327.
- [12] Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., Weiss, W., *Electrophoresis* 1995, **16**, 1079–1086.
- [13] Drews, O., Weiss, W., Reil, G., Parlar, H. *et al.*, *Proteomics* 2002, **2**, 765–774.
- [14] Olsson, I., Larsson, K., Palmgren, R., Bjellqvist, B., *Proteomics* 2002, **2**, 1630–1632.
- [15] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., *Anal. Chem.* 1996, **68**, 850–858.
- [16] Sanchez, J.-C., Chiappe, D., Converset, V., Hoogland, C. *et al.*, *Proteomics* 2001, **1**, 136–163.
- [17] Kratchmarova, I., Kalume, D. E., Blagoev, B., Scherer, P. E. *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* 2002, **1**, 213–222.

Association of the Polycystic Ovary Syndrome with Genomic Variants Related to Insulin Resistance, Type 2 Diabetes Mellitus, and Obesity

JOSÉ L. SAN MILLÁN, MARTA CORTÓN, GEMMA VILLUENDAS, JOSÉ SANCHO, BELÉN PERAL, AND HÉCTOR F. ESCOBAR-MORREALE

Departments of Molecular Genetics (J.L.S.M.) and Endocrinology (H.F.E.-M., G.V., J.S.), Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain; and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid (M.C., B.P.), 28029 Madrid, Spain

We have evaluated the possible association of polycystic ovary syndrome (PCOS) with 15 genomic variants previously described to influence insulin resistance, obesity, and/or type 2 diabetes mellitus.

Seventy-two PCOS patients and 42 healthy controls were genotyped for 15 variants in the genes encoding for paraoxonase (three variants), plasma cell differentiation antigen glycoprotein, human sorbin and SH3 domain containing 1, plasminogen activator inhibitor-1, peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2, protein tyrosine phosphatase 1B (two variants), adiponectin (two variants), IGF1, IGF2, IGF1 receptor, and IGF2 receptor.

Compared with controls, PCOS patients were more fre-

quently homozygous for the -108T variant in paraoxonase (36.6% vs. 9.5%; $P = 0.002$) and homozygous for G alleles of the *Apai* variant in IGF2 (62.9% vs. 38.1%; $P = 0.018$). Paraoxonase is a serum antioxidant enzyme and, because -108T alleles result in decreased paraoxonase expression, this increase in oxidative stress might result in insulin resistance. G alleles of the *Apai* variant in IGF2 may increase IGF2 expression, and IGF2 stimulates adrenal and ovarian androgen secretion.

In conclusion, the paraoxonase -108 C→T variant and the *Apai* polymorphism in the IGF2 gene are associated with PCOS and might contribute to increased oxidative stress, insulin resistance, and hyperandrogenism in this prevalent disorder. (*J Clin Endocrinol Metab* 89: 2640–2646, 2004)

THE POLYCYSTIC OVARY syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders in women of fertile age (1). As defined by endocrine criteria, PCOS is present in approximately 6.5% of women from Spain (2). Although hyperandrogenism and chronic anovulation are the key findings in PCOS patients, insulin resistance (3) and obesity (4) are frequently found in these patients.

The increase in serum insulin levels resulting from insulin resistance facilitates androgen secretion from the ovaries and the adrenals in PCOS patients (3), and obesity worsens the insulin resistance of these women. In conceptual agreement, amelioration of insulin resistance by weight loss (4) or by insulin-lowering drugs (5) improves hyperandrogenism in PCOS women.

Familial aggregation provides evidence supporting a genetic basis for PCOS (6), but the precise genetic mechanisms remain unknown despite significant efforts. Of note, hyperandrogenism and insulin resistance cosegregate in families of PCOS patients (7, 8), suggesting a common genetic origin of these disorders.

Considering the frequent association of PCOS with insulin

resistance and obesity, in the present case-control study we have conducted a systematic evaluation of the possible role in the pathogenesis of PCOS of 15 genomic variants located in 11 candidate genes, previously reported to influence the pathogenesis of insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and/or obesity. Specifically, we have studied genomic variants in the following genes: plasma cell differentiation antigen (PC-1) glycoprotein (9), human sorbin and SH3 domain containing 1 (SORBS1) (10), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (11), peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) (12, 13), paraoxonase (PON1) (14, 15), protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) (16), adiponectin (17, 18), IGF1 (19), IGF2 (20), IGF1 receptor (IGF1R), and IGF2 receptor (IGF2R) (21).

Subjects and Methods

Subjects

Seventy-two PCOS patients [age, 24.6 ± 6.9 yr (mean \pm SD; range, 14–42 yr); body mass index (BMI), 29.9 ± 8.6 kg/m² (range, 16.3–57.5 kg/m²)] and 42 healthy nonhyperandrogenic women [age, 31.1 ± 8.0 yr (range, 16–47 yr); BMI, 28.1 ± 7.8 kg/m² (range, 16.2–44.9 kg/m²)] were studied. PCOS was defined by oligo-ovulation, clinical and/or biochemical hyperandrogenism, and exclusion of hyperprolactinemia (serum prolactin <24 ng/ml), nonclassic congenital adrenal hyperplasia [ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone levels <10 ng/ml (22)], and androgen-secreting tumors (23). In these patients, evidence for oligo-ovulation was provided by chronic oligomenorrhea, by luteal phase progesterone less than 4 ng/ml, or by basal body temperature charts.

The control group was composed of lean female volunteers and consecutive patients referred to one of the authors (H.F.E.-M.) for dietary treatment of obesity. The controls were carefully evaluated to avoid any selection bias. None of the controls, either lean or obese, had signs or

Abbreviations: BMI, Body mass index; IGF1R, IGF1 receptor; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PC-1, plasma cell differentiation antigen glycoprotein; PCOS, polycystic ovary syndrome; PON1, paraoxonase; PPAR- γ 2, peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2; PTP1B, protein tyrosine phosphatase 1B; SORBS1, human sorbin and SH3 domain containing 1.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

symptoms of hyperandrogenism, menstrual dysfunction, or history of infertility before or after clinical and biochemical evaluation. All the controls presented with fasting glucose concentrations less than 110 mg/dl, and all had blood pressure less than 140/90 mm Hg.

The patients and controls had not taken hormonal medications, including contraceptive pills and antiobesity drugs, for the last 6 months. All the subjects were Caucasian. The ethics committee of the Hospital Ramón y Cajal approved the study, and informed consent was obtained from each patient and control or from the legal representatives in minors.

Protocol

Studies were performed between d 5 and 10 of the menstrual cycle or during amenorrhea after excluding pregnancy by proper testing. Hirsutism was quantified by a modified Ferriman-Gallwey score (24). Between 0800 and 0900 h after a 12-h overnight fast, an indwelling iv line was placed in a forearm vein, and after 15–30 min, basal blood samples were obtained for the measurement of total testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, sex hormone-binding globulin, glucose, and insulin. Samples were immediately centrifuged, and serum was separated and frozen at 20 °C until assayed.

The technical characteristics of the assays used for hormone measurements have been reported elsewhere (2, 25, 26). The free testosterone concentration was calculated from total testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations, assuming a serum albumin concentration of 43 g/liter and taking a value of 1×10^9 liters/mol for the association constant of sex hormone-binding globulin for total testosterone and a value of 3.6×10^4 liters/mol for that of albumin for total testosterone (27). Insulin resistance in the fasting state was estimated from glucose and insulin levels using the fasting insulin resistance index [glucose (mmol/liter) \times insulin (mU/liter)/25 (28)].

DNA extraction and genotype analyses

Genomic DNA from peripheral blood mononuclear cells was extracted using commercial DNA purification kits (Wizard genomic DNA purification kit, Promega, Madison, WI, and Nucleon BAC C3, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK). After DNA extraction, patients and controls were genotyped as follows: Genotyping of a dinucleotide repeat on IGF1 (19) and of a trinucleotide repeat on IGF1R gene (29) were performed by PCR using fluorescent dye-labeled forward primers, followed by use of an ABI310 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer sequences and allele sizes were described previously (19, 29). The PCR fragments were sized with an internal size standard using the GeneScan analysis software (Applied Biosystems). The dinucleotide repeat polymorphism in IGF1 resulted in six different alleles, sized 188, 190, 192, 194, 196, or 198 bp. This method was also used for genotyping of the ACAA-insertion/deletion polymorphism at the 3' nontranslated region (3'-UTR) of IGF2R gene, which results in alleles sized 140 or 144 bp (30).

Several variants were analyzed by PCR restriction fragment length polymorphism as previously described: *Apal* polymorphism in the 3'-UTR of the IGF2 (31); variant Lys121Gln in exon 4 of PC-1 gene (9); polymorphism Thr228Ala in exon 7 of SORBS1 (10); variant Pro12Ala in exon 2 of PPAR- γ 2 gene (32); variants 981 C \rightarrow T in exon 8 (33) and 1484

insG (16) in the 3'-UTR of PTP1B; polymorphism –675 4G/5G in the 5' regulatory region of PAI-1 gene (34); and polymorphisms –108 C \rightarrow T (35), Leu55Met, and Gln192Arg (36) in the PON1 gene.

Genotyping of polymorphisms 45 T \rightarrow G and 276 G \rightarrow T in the adiponectin gene (17) was performed by PCR restriction fragment length polymorphism using endonucleases *AvaI* and *BsmI*, respectively. Primers were designed from contig NT005962 (www.ncbi.nlm.nih.gov) for amplifying a 439-bp fragment (from nucleotide 2,301,053 to nucleotide 2,301,491) that includes both polymorphisms.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SD unless otherwise stated. The Kolmogorov-Smirnov statistic was applied to continuous variables. Logarithmic transformation was applied as needed to ensure normal distribution of the variables. Analysis of covariance was used to compare patients and controls, allowing correction for the difference in age between both groups.

To evaluate the association between discontinuous variables we used the χ^2 test and Fisher's exact test as appropriate. *A priori* power analysis of the differences in frequencies between PCOS patients and controls was conducted. Our sample size permitted the detection of effect sizes for the difference between frequencies (w) of 0.26 for the χ^2 test with one degree of freedom, and 0.29 for the χ^2 test with two degrees of freedom, used here. By convention, effects sizes for the differences between frequencies are considered very small or trivial when less than 0.10, small from 0.10–0.30, moderate from 0.30–0.50, and large when greater than 0.50 (37). Consequently, our sample size permitted the detection of small differences between the differences in PCOS patients and controls. On the contrary, very small and minor differences between frequencies in both groups of subjects may not have been detected in our study because of the relatively small sample size. Therefore, our study does not have the power to detect associations comparable to those already published for at least some variants (*i.e.* PPAR- γ 2).

Logistic regression was used to analyze the role of the genomic variants studied here as predictive factors for PCOS in our model. The backward likelihood-ratio test was used as the method for variable selection (38). Finally, the influence of the different genotypes on clinical and biochemical variables related to hyperandrogenism and to insulin resistance was analyzed by one-way ANOVA followed by the least-significant differences test for *post hoc* comparisons. Analyses were performed using SPSS 10 for the Macintosh (SPSS Inc., Chicago, IL) with the exception of power analysis, which was performed using the G*Power software (39). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The comparison of clinical, biochemical, and hormonal variables between PCOS patients and controls is shown in Table 1. Compared with controls, PCOS patients presented with increased hirsutism scores, total and calculated free testosterone levels, androstenedione, and fasting insulin levels; an increased fasting insulin resistance index; and decreased sex hormone-binding globulin concentrations.

TABLE 1. Clinical and biochemical variables in PCOS patients and healthy controls

	PCOS (n = 72)	Controls (n = 42)	P
Hirsutism score	13.2 \pm 6.6	1.6 \pm 1.4	<0.001
Total testosterone (ng/dl)	70 \pm 31	42 \pm 10	<0.001
Free testosterone (ng/dl)	1.3 \pm 0.9	0.6 \pm 0.3	<0.001
SHBG (μ g/dl)	314 \pm 174	545 \pm 242	<0.001
Dehydroepiandrosterone sulfate (ng/ml)	2686 \pm 1408	1833 \pm 897	0.058
Basal androstenedione (ng/ml)	3.9 \pm 1.4	2.6 \pm 0.9	<0.001
Fasting glucose (mg/dl)	86 \pm 9	87 \pm 10	0.385
Fasting insulin (μ U/ml)	16 \pm 10	11 \pm 7	<0.010
Fasting insulin resistance index (mmol/mU \cdot liter ²)	3.2 \pm 2.2	2.2 \pm 1.4	<0.010

Data are means \pm SD. The mean values were compared by analysis of covariance to correct for the difference in age between patients and controls. Normality was ensured by logarithmic transformation as needed. To convert to SI units, multiply total testosterone by 0.03467 (result in nmol/liter), free testosterone by 34.67 (result in pmol/liter), sex hormone-binding globulin by 0.111 (result in nmol/liter), dehydroepiandrosterone sulfate by 0.002714 (result in μ mol/liter), glucose by 0.0555 (result in mmol/liter), and insulin by 6.945 (result in pmol/liter).

The distribution of the different genotypes according to the 15 variants studied here, in PCOS patients compared with controls, are shown in Table 2. Only the –108 C→T polymorphism in PON1 and the *ApaI* variant in IGF2 were distributed differently in PCOS patients compared with controls. However, and although the distribution of the remaining variants was not statistically different between PCOS patients and controls, it should be noted that the relatively limited sample size of our study precludes ruling out very small and minor differences in the distribution of these variants between PCOS patients and control, especially in the distribution of PPAR- γ 2 and PAI-1 genotypes which showed *P* values close to 0.1.

In agreement with the different distribution of the PON1 and IGF2 genotypes cited above, PCOS patients were more frequently homozygous for the –108T variant in PON1

(PCOS, 36.6% *vs.* controls, 9.5%; $\chi^2 = 9.9$; *P* = 0.002) and homozygous for G alleles of the *ApaI* IGF2 variant (PCOS, 62.9% *vs.* controls, 38.1%; $\chi^2 = 6.5$; *P* = 0.018), compared with healthy controls. Of note, the association of PCOS with homozygosity for the –108T variant in PON1 retained statistical significance even after applying an *a priori* Bonferroni correction to the level of significance, which was reset from *P* < 0.05 to *P* < 0.0034 considering the 15 variants tested in this study.

To evaluate the contribution of the genomic variants studied here to PCOS, a logistic regression model was used. The dependent variable of the model was coded 1 for PCOS patients and 0 for healthy controls. All the genomic variables studied here were introduced as independent variables.

The model only retained homozygosity for the –108T variant in PON1 (odds ratio = 7.09; 95% CI = 2.08–23.81; *P* =

TABLE 2. Frequencies of the genotypes according to the 15 variants included in the study in PCOS patients compared with healthy controls

Gene	Genotype	Healthy women (n = 42)	PCOS patients (n = 72)	χ^2	<i>P</i> value
PON1	–108 TT	0.095	0.366	10.996	0.004
	–108 TC	0.619	0.366		
	–108 CC	0.286	0.268		
PON1	Leu55Leu	0.333	0.362	1.370	0.504
	Leu55Met	0.452	0.348		
	Met55Met	0.214	0.290		
PON1	Gln192Gln	0.571	0.580	0.946	0.623
	Gln192Arg	0.286	0.333		
	Arg192Arg	0.143	0.087		
IGF2	<i>ApaI</i> AA	0.095	0.114	8.320	0.016
	<i>ApaI</i> GA	0.524	0.257		
	<i>ApaI</i> GG	0.381	0.629		
IGF2R	Homozygous 140-bp allele	0.071	0.072	0.553	0.758
	Heterozygous 140/144-bp alleles	0.476	0.406		
	Homozygous 144-bp allele	0.452	0.522		
IGF1 ^a	Homozygous 192-bp allele	0.452	0.394	0.368	0.832
	Heterozygous 192-bp allele	0.405	0.451		
	Noncarrier 192-bp allele	0.143	0.155		
IGF1R	Homozygous 90-bp allele	0.143	0.088	0.935	0.626
	Heterozygous 90/93-bp alleles	0.571	0.574		
	Homozygous 93-bp allele	0.286	0.338		
SORBS1	Thr228Thr	0.857	0.871	0.046	1.000
	Thr228Ala	0.143	0.129		
Adiponectin	T45T	0.690	0.667	0.114	0.945
	T45G	0.286	0.300		
	G45G	0.024	0.033		
Adiponectin	G276G	0.429	0.387	0.610	0.737
	G276T	0.476	0.468		
	T276T	0.095	0.145		
PPAR γ -2	Pro12Pro	0.786	0.900	4.240	0.120 ^b
	Pro12Ala	0.214	0.086		
	Ala12Ala	0.000	0.014		
PTP1B	Wild-type/wild-type	0.929	0.898	0.277	0.732
	Wild-type/Ins1484G	0.071	0.102		
PTP1B	C981C	0.833	0.881	0.474	0.565
	C981T	0.167	0.119		
PC-1	Lys121Lys	0.619	0.714	1.958	0.376
	Lys121Gln	0.381	0.271		
	Gln121Gln	0.000	0.014		
PAI-1	–675 4G/4G	0.190	0.254	3.442	0.179 ^b
	–675 4G/5G	0.405	0.507		
	–675 5G/5G	0.405	0.239		

Data are frequencies.

^a The IGF1 polymorphism was coded depending on the presence or absence of the common 192-bp allele (19).

^b Because of the small sample size, these nonsignificant results lack the statistical power to definitely rule out the small differences found between the frequencies of these genomic variants in PCOS patients and controls.

0.002) and homozygosity for G alleles of the *ApaI* variant in IGF2 (odds ratio = 3.10; 95% CI = 1.25–7.64; $P = 0.014$) for the prediction of PCOS (Nagelkerke's $R^2 = 0.214$).

Finally, we studied the influence of the genomic variants on clinical and biochemical markers of hyperandrogenism, BMI, and insulin resistance, including PCOS patients and healthy controls as a whole. As expected from its association with PCOS, and compared with carriers of –108C alleles, subjects homozygous for –108T alleles of the –108 C→T polymorphism in PON1 presented with increased hirsutism scores (12.8 ± 8.6 vs. 8.1 ± 7.1 ; $P = 0.005$) and total testosterone (73 ± 37 vs. 55 ± 25 ng/dl; $P = 0.003$), free testosterone (1.5 ± 1.2 vs. 0.9 ± 0.5 ng/dl; $P = 0.001$), and androstenedione (4.3 ± 1.4 vs. 3.1 ± 1.3 ng/ml; $P = 0.001$) concentrations.

Of the variants not associated with PCOS, only the PON1 Leu55Met, IGF1R, and SORBS1 polymorphisms resulted in differences in some of the clinical and biochemical variables studied here.

Compared with carriers of the common 55L allele in PON1, subjects homozygous for 55M alleles presented with increased BMI (31.9 ± 9.5 vs. 28.3 ± 7.7 kg/m²; $P = 0.045$), fasting insulin (17 ± 9 vs. 13 ± 9 μ U/ml; $P = 0.033$), and glucose concentrations (90 ± 10 vs. 85 ± 9 mg/dl; $P = 0.029$) and increased fasting insulin resistance index (3.5 ± 2.1 vs. 2.6 ± 1.9 ; $P = 0.022$). Subjects homozygous for 90-bp alleles of IGF1R presented with increased fasting glucose levels (93 ± 8 vs. 86 ± 10 mg/dl; $P = 0.015$), increased fasting insulin resistance index (3.81 ± 1.70 vs. 2.69 ± 2.01 ; $P = 0.030$), and an almost significant increase in fasting insulin concentrations (18 ± 8 vs. 14 ± 9 μ U/ml; $P = 0.05$) compared with carriers of 93-bp alleles. Also, carriers of Ala228 alleles of SORBS1 presented with increased BMI compared with subjects homozygous for 228T alleles (34.5 ± 7.9 vs. 28.4 ± 8.1 kg/m²; $P = 0.008$). Finally, no other variant included in the study influenced any phenotypic trait characteristic of PCOS, obesity, or insulin resistance (data not shown).

Discussion

Initial studies regarding the genetics of PCOS suggested a model in which a few genes played a major effect on its inheritance (40). However, the number of genomic variants associated with PCOS is growing rapidly, suggesting that PCOS may result from the interaction of multiple genomic variants with environmental factors such as obesity and a sedentary lifestyle.

Certain genomic variants associated with components of the metabolic syndrome might have provided a survival advantage during the process of natural selection (41). Hyperandrogenism may have also favored survival during evolution, as proposed by Witchel *et al.* (42) for carriers of 21-hydroxylase deficiency. Considering the frequent association of PCOS with components of the metabolic syndrome, such as insulin resistance (3) and obesity (4), genomic variants associated with the metabolic syndrome should be considered candidate genes to explain PCOS inheritance, even more so when hyperandrogenemia cosegregates with insulin resistance within families of PCOS probands (7, 8), irrespective of the presence or absence of menstrual irregularity (7).

Of the 15 variants studied here, we have been able to

demonstrate the association of PCOS with the –108 C→T variant in PON1 and with the *ApaI* variant in IGF2. Moreover, the association of PCOS with homozygosity for T alleles of the –108 C→T variant in PON1 persisted even after correcting for multiple testing, further suggesting that this association did not result merely from chance.

Regarding the association of homozygosity for –108T alleles of PON1 with PCOS, our present results are in conceptual agreement with previous reports, considering that PCOS is associated with insulin resistance (3), and homozygosity for –108T alleles is more frequent in nondiabetic subjects showing abnormal fasting glucose concentrations, and therefore suspected to have insulin resistance, compared with subjects with normal serum glucose concentrations (15).

The PON1 gene is expressed mainly in the liver and encodes for serum paraoxonase, which is an antioxidant high-density lipoprotein-associated enzyme. Liver PON1 mRNA expression is influenced by genetic and environmental factors, and both androgens and proinflammatory mediators decrease liver PON1 expression (43). Interestingly, both androgen excess and proinflammatory genotypes contribute to the pathogenesis of PCOS (44–46). The –108 C→T polymorphism is responsible of approximately 23% of PON1 expression levels in some cell systems, in which –108TT constructs showed reduced PON1 expression compared with –108CC constructs (35). Therefore, we speculate that homozygosity for –108T alleles, hyperandrogenism, and proinflammatory genotypes might contribute to reduced PON1 expression, resulting in a higher oxidative stress in these women.

Because oxidative stress may impair insulin action (47), reduced serum paraoxonase activity may contribute to insulin resistance. This hypothesis is supported by the finding of reduced serum paraoxonase activity in insulin-resistant disorders such as type 2 diabetes mellitus (48, 49) and cardiovascular atherosclerotic disease (50, 51). If confirmed in future studies, the association of homozygosity for –108T alleles of PON1 with PCOS might contribute to explain the insulin resistance and the increased risk for atherosclerosis associated with this syndrome (52).

In our series, the Leu55Met and Gln192Arg polymorphisms in PON1 were not associated with PCOS, but subjects homozygous for Met55 alleles presented with a higher BMI and increased indexes of insulin resistance, as previously suggested by others (14, 53).

G alleles of the *ApaI* polymorphism in the IGF2 gene increase IGF2 mRNA in leukocytes compared with A alleles (54) and possibly result in increased liver IGF2 expression and secretion (55). IGF2 stimulates adrenal (56, 57) and ovarian (58) androgen secretion and, together with IGF1 and IGF binding proteins, has been suggested to play a role in the pathogenesis of PCOS (56, 58, 59). Therefore, increased IGF2 levels resulting from G alleles of the *ApaI* polymorphism in the IGF2 gene might contribute to hyperandrogenism and may explain the association with PCOS.

Moreover, our findings regarding the *ApaI* polymorphism in the IGF2 gene are in conceptual agreement with previous reports in different populations. In a large series of middle-aged males, BMI was increased in subjects homozygous for the common G allele compared with those homozygous for A alleles of the *ApaI* polymorphism in the IGF2 gene (55), and

obesity is a common finding in PCOS women (4). However, we have not found a direct influence of the *ApaI* polymorphism in the *IGF2* gene on BMI, but we included only women in our study.

Other genomic variants, which were not associated with PCOS, influenced phenotypic traits associated with obesity and insulin resistance. In addition to the effects of the *Leu55Met* polymorphism in *PON1* on BMI and indexes of insulin resistance described above, carriers of *Ala228* alleles of *SORBS1* presented with increased BMI when compared with subjects homozygous for *Thr228* alleles, in conceptual agreement with a large study conducted in Europe (60). In the latter, the *Thr228Ala* polymorphism in *SORBS1* was equally distributed among obese and lean subjects, but subjects homozygous for *Ala228* alleles were found only in obese patients (60).

In our series, women homozygous for 90-bp alleles of *IGF1R* had increased indexes of insulin resistance compared with carriers of 93-bp alleles. In conceptual agreement, the *IGF1R* gene has been proposed as a candidate for insulin resistance-associated traits, although conflicting reports have been observed depending on the population studied (61).

On the contrary, we have not been able to confirm previous reports regarding the influence of other genomic variants on phenotypic traits associated with the metabolic syndrome. However, because of the relatively small sample size of our study, these negative findings lack the statistical power needed to rule out a minor role for these genomic variants on PCOS or on other insulin resistance-associated traits. Therefore, our present data must not be considered as definite evidence against the involvement of these variants in PCOS and in insulin resistance. This consideration is especially important for variants such as the *Pro12Ala* polymorphism in the *PPAR-γ2* gene and the -675 4G/5G polymorphism in *PAI-1*, which showed small but considerable differences in the frequencies in PCOS patients compared with controls between 0.10 and 0.17, with *P* values that were close to 0.1.

The differences in the distribution of these variants might have reached statistical significance if analyzed in larger series, explaining the conflicting results with previous studies by others; *Ala12* alleles of the *PPAR-γ2* gene have been shown to favor weight gain in obese adults (62) and in obese hyperandrogenic girls and adolescents (32) and also to preserve insulin sensitivity in Caucasian men (12) and in Caucasian women presenting with PCOS (13). However, the later study did not include healthy women (13), and therefore no differences between PCOS patients and controls in the allele frequencies of the *Pro12Ala* variant in the *PPAR-γ2* gene has been reported to date. Also, an increased frequency of 4G alleles of the -675 4G/5G polymorphism in *PAI-1* has been reported in PCOS patients (63).

On the contrary, the differences between the frequencies in PCOS patients and controls of the other variants not associated with PCOS in our study were less than 0.10. These differences should be considered very small (37) had the differences between frequencies reached statistical significance if a larger sample size was used, and therefore unlikely to play an important role for the pathogenesis of PCOS.

The *IGF2R* polymorphism was not associated with PCOS in our series, despite the evidence for linkage found in non-

diabetic Mexican-Americans between insulin-resistant phenotypes and the *D6S264* marker close to the *IGF2R* gene (21). We did not find any association of polymorphisms in the *adiponectin* gene with PCOS, in contrast with the increased risk for type 2 diabetes in subjects homozygous for 45G in the Japanese (17). And also, none of the polymorphisms in the *PTP1B* gene was associated with PCOS or influenced insulin resistance indexes, in contrast to the higher values of insulin resistance measured by the homeostasis model assessment observed in men carrying the 1484ins allele (16), or the reduction of the risk for type 2 diabetes in the Oji-Cree subjects carrying 981T alleles (33).

We have also not found any association of the *Lys121Gln* variant in *PC-1* with PCOS. *PC-1* inhibits tyrosine kinase activity of the insulin receptor, and increases in the *PC-1* content in fibroblasts from normal glucose-tolerant subjects are related to decreased insulin action *in vivo* and *in vitro* (64). Subsequently, *Gln121* alleles of *PC-1* have been proposed to increase insulin resistance (9, 65), although conflicting results have been found in different populations (66). Finally, the *IGF-1* variant was not associated with PCOS or insulin resistance-associated traits in our study, even considering that noncarriers of 192-bp alleles have an increased risk for type 2 diabetes mellitus, and myocardial infarction, in the Dutch population (19).

In summary, our results suggest that genomic variants in the genes encoding *PON1* and *IGF2* are associated with PCOS. Also, some of these variants (and others in the *SORBS1* and *IGF1R* genes) influence clinical and biochemical variables related to hyperandrogenism, obesity, and insulin resistance.

Considering that to date a large number of genomic variants has been found to be associated with PCOS, and that many of these associations have not been replicated when studied in different populations, the emerging picture is that of a multigenic etiology for this disorder, in which nongenetic factors also have a strong influence on its development.

The pathogenesis of PCOS may be influenced by complex interactions between predisposing and protective genomic variants with environmental factors, such as diet and exercise. And because the latter are subject of considerable ethnic, geographic, and even familial variability, the genomic variants resulting in PCOS may also be different depending on these factors. Additional studies in large populations of PCOS patients, in which these environmental factors are clearly defined, will undoubtedly help in the identification of the genes involved in the pathogenesis of this prevalent disorder.

Acknowledgments

We thank Ms. Genoveva González for excellent technical help.

Received August 1, 2003. Accepted February 23, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Héctor F. Escobar-Morreale, M.D., Ph.D., Department of Endocrinology, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar km. 9100, 28034 Madrid, Spain. E-mail: hescobarm.hrc@salud.madrid.org.

This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FIS 00/0414, 02/0741, and 02/0578 and RGDM G03/212).

and from the Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, Spain (CAM 08.6/0024/2000 and 08.6/0010/2001).

Results from this work were presented at the 85th Annual Meeting of The Endocrine Society, Philadelphia, PA, June 2003.

References

- Carmina E, Lobo RA 1999 Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1897–1899
- Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF 2000 A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2434–2438
- Dunaif A 1997 Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18:774–800
- Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R 2002 Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:883–896
- Iuorno MJ, Nestler JE 2001 Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 28:153–164
- Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, Fox J, Dunaif A 1998 Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14956–14960
- Legro RS, Bentley-Lewis R, Driscoll D, Wang SC, Dunaif A 2002 Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2128–2133
- Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, Bayraktar M 2003 Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2031–2036
- Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, Ercolino T, Scarlato G, Iacoviello L, Vigneri R, Tassi V, Trischitta V 1999 A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 48:1881–1884
- Lin WH, Chiu KC, Chang HM, Lee KC, Tai TY, Chuang LM 2001 Molecular scanning of the human sorbin and SH3-domain-containing-1 (SORBS1) gene: positive association of the T228A polymorphism with obesity and type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 10:1753–1760
- Hoffstedt J, Andersson IL, Persson L, Isaksson B, Arner P 2002 The common –675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* 45:584–587
- Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, Drivsholm T, Berglund L, Hansen T, Lithell H, Pedersen O 2001 Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. *Diabetologia* 44:1170–1176
- Hara M, Alcoser SY, Qaadir A, Beiswenger KK, Cox NJ, Ehrmann DA 2002 Insulin resistance is attenuated in women with polycystic ovary syndrome with the Pro12Ala polymorphism in the PPAR γ gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87:772–775
- Barbieri M, Bonafe M, Marfella R, Ragno E, Giugliano D, Franceschi C, Paolisso G 2002 LL-paraoxonase genotype is associated with a more severe degree of homeostasis model assessment IR in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 87:222–225
- Levie I, Kalix B, Brulhart Meynet MC, James RW 2001 The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia* 44:1177–1183
- Di Paola R, Frittitta L, Miscio G, Bozzali M, Baratta R, Centra M, Spampinato D, Santagati MG, Ercolino T, Cisternino C, Soccio T, Mastroianno S, Tassi V, Almgren P, Pizzuti A, Vigneri R, Trischitta V 2002 A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance. *Am J Hum Genet* 70:806–812
- Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T 2002 Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51:536–540
- Stumvoll M, Tritschler O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M, Machicao F, Haring H 2002 Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:37–41
- Vaessen N, Heutink P, Janssen JA, Witteman JC, Testers L, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM 2001 A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* 50:637–642
- Gaunt TR, Cooper JA, Miller GJ, Day IN, O'Dell SD 2001 Positive associations between single nucleotide polymorphisms in the IGF2 gene region and body mass index in adult males. *Hum Mol Genet* 10:1491–1501
- Duggirala R, Blangero J, Almasry L, Arya R, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP 2001 A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 68:1149–1164
- Azziz R, Dewailly D, Owerbach D 1994 Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 78:810–815
- Zawadzki JK, Dunaif A 1992 Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, eds. *Polycystic ovary syndrome*. Boston: Blackwell Scientific Publications; 377–384
- Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D 1981 Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* 140:815–830
- Escobar-Morreale HF, Serrano-Gotarredona J, Varela C, García-Robles R, Sancho JM 1997 Circulating leptin concentrations in women with hirsutism. *Fertil Steril* 68:898–906
- Escobar-Morreale HF, Avila S, Sancho J 2000 Serum prostate-specific antigen concentrations are not useful for monitoring the treatment of hirsutism with oral contraceptive pills. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2488–2492
- Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM 1999 A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3666–3672
- Bastard JP, Grimaldi A, Jardel C, Porquet D, Bruckert E, Hainque B 1997 A simple index of insulin resistance. *Diabetes Metab* 23:87–88
- Meloni R, Fougereuse F, Roudaut C, Beckmann JS 1992 Trinucleotide repeat polymorphism at the human insulin-like growth factor I receptor gene (IGF1R). *Nucleic Acids Res* 20:1427
- Smrzka OW, Fae I, Stoger R, Kurzbauer R, Fischer GF, Henn T, Weith A, Barlow DP 1995 Conservation of a maternal-specific methylation signal at the human IGF2R locus. *Hum Mol Genet* 4:1945–1952
- Tadokoro K, Fujii H, Inoue T, Yamada M 1991 Polymerase chain reaction (PCR) for detection of Apal polymorphism at the insulin like growth factor II gene (IGF2). *Nucleic Acids Res* 19:6967
- Witchel SF, White C, Siegel ME, Aston CE 2001 Inconsistent effects of the proline12 \rightarrow alanine variant of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene on body mass index in children and adolescent girls. *Fertil Steril* 76:741–747
- Mok A, Cao H, Zinman B, Hanley AJ, Harris SB, Kennedy BP, Hegele RA 2002 A single nucleotide polymorphism in protein tyrosine phosphatase PTP-1B is associated with protection from diabetes or impaired glucose tolerance in Oji-Cree. *J Clin Endocrinol Metab* 87:724–727
- Brown NJ, Murphey LJ, Srikuma N, Koschachuanan N, Williams GH, Vaughan DE 2001 Interactive effect of PAI-1 4G/5G genotype and salt intake on PAI-1 antigen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1071–1077
- Brophy VH, Jamps RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE 2001 Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 68:1428–1436
- Humbert R, Adler DA, Distechi CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE 1993 The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3:73–76
- Cohen J 1988 Statistical power analysis for the behavioral sciences, 2nd ed. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum
- Norusis MJ 1999 SPSS regression models 10.0. Chicago: SPSS Inc.
- Buchner A, Faul F, Erdfelder E 1997 G*Power: A priori, post-hoc, and compromise power analyses for the Macintosh, 2.1.2 ed. Trier, Germany: University of Trier
- Legro RS, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss 3rd JF, Dunaif A 1998 Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res* 53:217–256
- Fernandez-Real JM, Ricart W 1999 Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia* 42:1367–1374
- Witchel SF, Lee PA, Suda-Hartman M, Trucco M, Hoffman EP 1997 Evidence for a heterozygote advantage in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2097–2101
- bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK 2003 Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med* 34:824–829
- Villuendas G, San Millán JL, Sancho J, Escobar-Morreale HF 2002 The –597 G \rightarrow A and –174 G \rightarrow C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1134–1141
- Peral B, San Millán JL, Castello R, Moghetti P, Escobar-Morreale HF 2002 The methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3977–3983
- Escobar-Morreale HF, Calvo RM, Villuendas G, Sancho J, San Millán JL 2003 Association of polymorphisms in the interleukin 6 receptor complex with obesity and hyperandrogenism. *Obes Res* 11:987–996
- Rudich A, Kozlovsky N, Potashnik R, Bashan N 1997 Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 272:E935–E940
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJ, Durrington PN 1998 Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 139:341–349

49. Sakai T, Matsuura B, Onji M 1998 Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus. *Intern Med* 37:581–584
50. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MC 2000 Promoter polymorphism T(–107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49:1390–1393
51. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE 2000 Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2441–2447
52. Solomon CG 1999 The epidemiology of polycystic ovary syndrome: prevalence and associated disease risks. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28:247–263
53. Deakin S, Leviev I, Nicaud V, Brulhart Meynet MC, Tiret L, James RW 2002 Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1268–1273
54. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Grabs R, Polychronakos C 1998 Divergence between genetic determinants of IGF2 transcription levels in leukocytes and of IDDM2-encoded susceptibility to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2933–2939
55. O'Dell SD, Miller GJ, Cooper JA, Hindmarsh PC, Pringle PJ, Ford H, Humphries SE, Day IN 1997 A polymorphism in insulin-like growth factor II (IGF2) gene and weight in middle-aged males. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:822–825
56. Mesiano S, Katz SL, Lee JY, Jaffe RB 1997 Insulin-like growth factors augment steroid production and expression of steroidogenic enzymes in human fetal adrenal cortical cells: implications for adrenal androgen regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1390–1396
57. l'Allemand D, Penhoat A, Lebrethon MC, Ardevol R, Baehr V, Oelkers W, Saez JM 1996 Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3892–3897
58. Cara JF 1994 Insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins and ovarian androgen production. *Horm Res* 42:49–54
59. Barreca A, Del Monte P, Ponzani P, Artini PG, Genazzani AR, Minuto F 1996 Intrafollicular insulin-like growth factor-II levels in normally ovulating women and in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 65:739–745
60. Nieters A, Becker N, Linseisen J 2002 Polymorphisms in candidate obesity genes and their interaction with dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids affect obesity risk in a sub-sample of the EPIC-Heidelberg cohort. *Eur J Nutr* 41:210–221
61. Rasmussen SK, Lautier C, Hansen L, Echwald SM, Hansen T, Ekstrom CT, Urhammer SA, Borch-Johnsen K, Grigorescu F, Smith RJ, Pedersen O 2000 Studies of the variability of the genes encoding the insulin-like growth factor I receptor and its ligand in relation to type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1606–1610
62. Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O 1999 Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 42:892–895
63. Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, Tracy T, Sieve-Smith L 1999 Metformin-induced resumption of normal menses in 39 of 43 (91%) previously amenorrheic women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 48:511–519
64. Frittitta L, Spampinato D, Solini A, Nosadini R, Goldfine ID, Vigneri R, Trischitta V 1998 Elevated PC-1 content in cultured skin fibroblasts correlates with decreased in vivo and in vitro insulin action in nondiabetic subjects: evidence that PC-1 may be an intrinsic factor in impaired insulin receptor signaling. *Diabetes* 47:1095–1100
65. Frittitta L, Baratta R, Spampinato D, Di Paola R, Pizzuti A, Vigneri R, Trischitta V 2001 The Q121 PC-1 variant and obesity have additive and independent effects in causing insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5888–5891
66. Rasmussen SK, Urhammer SA, Pizzuti A, Echwald SM, Ekstrom CT, Hansen L, Hansen T, Borch-Johnsen K, Frittitta L, Trischitta V, Pedersen O 2000 The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. *Diabetes* 49:1608–1611

TITLE: Differential Gene Expression Profile in Omental Adipose Tissue in Women with Polycystic Ovary Syndrome.

SHORT TITLE: Expression Profiling of Omental Fat in PCOS

AUTHORS: MARTA CORTÓN¹, JOSÉ I. BOTELLA-CARRETERO², ALBERTO BENGURÍA³, GEMMA VILLUENDAS², ANGEL ZABALLOS³, JOSÉ L. SAN MILLÁN⁴, HÉCTOR F. ESCOBAR-MORREALE², AND BELÉN PERAL¹

AFFILIATION:

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid, E-28029 Madrid, Spain.

²Department of Endocrinology, Hospital Ramón y Cajal & Universidad de Alcalá, E-28034 Madrid, Spain.

³Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Madrid, Spain.

⁴Department of Molecular Genetics, Hospital Universitario Ramón y Cajal, E-28034 Madrid, Spain.

REQUEST FOR REPRINTS: Belén Peral, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid, Spain. E-mail: bperal@iib.uam.es

EDITORIAL CORRESPONDENCE: Héctor F. Escobar-Morreale, M.D., Ph.D. Department of Endocrinology, Hospital Ramón y Cajal & University of Alcalá, Carretera de Colmenar km 9'1, Madrid E-28034, Spain. Phone / Fax No. +34 - 91 336 9029. E-mail: hescobarm.hrc@salud.madrid.org

GRANTS: This work was supported by Grants PI020578, PI020741, PI050341, PI050551, RCMN C03/08 and RGDM 03/212 from Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, and Grants 08.6/0021/2003 and GR/SAL/0137/2004 from the Consejería de Educación y Cultura, Comunidad de Madrid, Spain.

DISCLOSURE STATEMENT: The Authors have nothing to declare.

WORD COUNT: 4117

WORDS IN ABSTRACT: 228

NUMBER OF FIGURES: 2

NUMBER OF TABLES: 5

NUMBER OF REFERENCES: 57

ABSTRACT

Context The polycystic ovary syndrome (PCOS) is frequently associated with visceral obesity, suggesting that omental adipose tissue might play an important role in the pathogenesis of the syndrome.

Objective To the study of the expression profiles of omental fat biopsies obtained from morbidly obese women with or without PCOS at the time of bariatric surgery.

Design Case-control study

Settings Academic hospital.

Patients Eight PCOS patients and 7 non-hyperandrogenic women submitted to bariatric surgery because of morbid obesity.

Interventions Biopsies of omental fat were obtained during bariatric surgery

Main Outcome Measures High-density oligonucleotide arrays.

Results After statistical analysis, we identified changes in the expression patterns of 63 genes between PCOS and control samples. Gene classification was assessed through data mining of Gene Ontology annotations, and cluster analysis of dysregulated genes between both groups. These methods highlighted abnormal expression of genes encoding certain components of several biological pathways related to insulin- and Wnt-signaling, to oxidative stress, inflammation, immune function and lipid metabolism, as well as other genes previously related to PCOS or to the metabolic syndrome.

Conclusions The differences in the gene expression profiles in visceral adipose tissue of PCOS patients compared with non-hyperandrogenic women involve multiple genes related to several biological pathways, suggesting that the involvement of abdominal obesity in the pathogenesis of PCOS is more ample than previously thought, and not restricted to the induction of insulin resistance.

KEY WORDS: Microarrays, gene expression, visceral fat, hyperandrogenism, biological pathways

63 The polycystic ovary syndrome (PCOS) appears to be a complex disorder in terms of inheritance, in
64 which protective and predisposing genomic variants interfere with a very important environmental
65 influence, including diet and life-style, leading to the syndrome's phenotype (1).

66 Obesity plays a very important role in the development of PCOS in many women. PCOS patients
67 are frequently obese (2): in as many as 42% of women with PCOS were overweight or obese in
68 population-based studies conducted in the U.S.A. (3). Conversely, PCOS is probably the most common
69 association of obesity in premenopausal women, because 28% of overweight and obese women suffer this
70 prevalent disorder (4). This association may be explained by the secretion by adipose tissue of several
71 mediators, including cytokines and adipokines, that favors the insulin resistant and low-grade chronic
72 inflammatory state characteristic of PCOS (1, 5-7).

73 But also, the hyperandrogenism characteristic of PCOS may influence the pathophysiology of
74 obesity. Androgen excess during fetal life or during the early postnatal period induced abdominal
75 adiposity and an adverse metabolic profile in animal models (8), and a similar mechanism might occur in
76 humans (9). Furthermore, girls with premature pubarche – a form of prepubertal hyperandrogenism that
77 predisposes these girls to PCOS – have insulin resistance throughout puberty (10), and treatment with
78 antiandrogens may contribute to ameliorate the insulin resistance of these girls (11). Therefore, possibility
79 exists that women with PCOS suffer a vicious circle that starts with hyperandrogenism favoring an
80 abdominal visceral deposition of fat that induces insulin resistance, and the resulting hyperinsulinemia
81 further facilitates androgen secretion in these patients (12).

82 Given the central role of visceral adipose tissue in the development of PCOS in overweight and
83 obese women, we have considered of interest the study of the expression profiles of omental fat biopsies
84 obtained from morbidly obese women with or without PCOS at the time of bariatric surgery. Compared
85 with classic molecular genetic approaches, our present experimental design had the theoretical advantages
86 of using a hypothesis-free approach to find genes dysregulated in the visceral fat of PCOS patients, as well
87 as providing an integrative view of the interaction of genomic variants with environmental influences that
88 result in gene expression in adipose tissue.

MATERIALS AND METHODS

Subjects, Sampling and Surgical Procedure

Fifteen morbidly obese premenopausal women submitted for bariatric surgery, including eight PCOS patients (age 31.6 ± 7.9 yr; body mass index (BMI) 51.0 ± 10.2 kg/m², range, 41 - 75 kg/m²) and seven non-hyperandrogenic women (age 40.4 ± 3.6 yr; BMI 52.8 ± 5 kg/m², range 44 - 58) were included. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of Hospital Ramón y Cajal. Signed informed consent was obtained from all subjects.

The diagnosis of PCOS was established by the presence of oligo-ovulation, clinical and/or biochemical hyperandrogenism, and exclusion of hyperprolactinemia, non-classic congenital adrenal hyperplasia and androgen-secreting tumors (13). Hirsutism was quantified by the modified Ferriman-Gallwey score (14). Evidence for oligo-ovulation was provided by chronic oligomenorrhea or amenorrhea in all the patients. The controls had no signs of hyperandrogenism, and had regular menstrual cycles every 26 to 34 days. None of the patients and controls was being treated with insulin sensitizers, statins or hormonal therapy.

After a 12-h overnight fast basal blood samples were obtained for the measurement of serum glucose, insulin, prolactin, total testosterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), 17-hydroxyprogesterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone-sulfate. The technical characteristics of the assays employed for hormone measurements have been reported elsewhere (15). The free testosterone concentration was calculated from total testosterone and SHBG concentrations (16). Insulin resistance in the fasting state (HOMA-IR) was determined using homeostasis model assessment (17).

The indication for bariatric surgery was morbid obesity in all patients, as defined by BMI ≥ 40 kg/m² (18). During surgery, biopsies of omental fat were obtained, washed in chilled NaCl 0.9% solution, partitioned into pieces, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA preparation. The surgeon aimed to obtain the samples from similar anatomical locations in all the women, and patients and controls were submitted to the same anesthetic procedures to avoid a potential effect on

the expression of susceptible genes such as those related to stress and inflammation.

RNA Isolation, Array Hybridization and Data Processing

Total RNA was extracted from omental adipose tissue (500 mg) using Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) followed by the Qiagen Rneasy kit (Qiagen N.V., Venlo, The Netherlands) and was tested for degradation using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA). cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using T7-(dT)₂₄ oligonucleotide (Superscript II ReverseTranscriptase®; Invitrogen Corp.). *In vitro* transcription was performed using BioArray High Yield RNA transcript labeling kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY) to produce biotin labeled cRNA. 5 µg of fragmented cRNA were used for the TestChip (Test3, Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). After quality control 15 µg of cRNA were hybridized for 16 h at 45°C to the Affymetrix HG-U133A chip. Each microarray was washed and stained in the Affymetrix Fluidics Station 400 following the standard protocols. Microarrays were scanned at 3 µm resolution in an Agilent HP G2500A GeneArray scanner. A very high experimental reproducibility ($r^2 > 0.97$), as assessed by hybridizing two arrays with RNA from the same sample, was found. Furthermore, the concordance of the results of pairs of arrays hybridized using RNA from different women was also high ($0.97 > r^2 > 0.84$), indicating low inter-individual variability in the gene expression of omental fat.

Data analyses were performed using Affymetrix Microarray Suite 5.0 software and images from each gene chip were normalized by the global scaling method to a target intensity value of 100, following the manufacturer's instructions. Also we used the Robust Multi-Array Analysis (RMA) algorithm for normalization, by applying the RMA Express software (19). To reduce the complexity of data, the expression analysis was restricted to a subset of reproducibly expressed probe sets that significantly varied among the data. Probe sets with "absent calls" across all samples and/or absolute fold change < 1.2 were filtered out. Complete data sets are available from the NCBI, Gene Expression Omnibus website, accession number GSE5090.

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA, with random hexamers and the *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). qPCR was performed in the *ABI Prism 7900HT* employing specific primers and probes for target genes (TaqMan® Low Density Array System, Applied Biosystems). cDNAs were diluted to a final concentration of 0.5 ng/µl and incubated at 95°C for 10 min followed by 40 cycles (15 s at 95°C and 1 min at 60°C). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) and glucuronidase beta (GUSB) were included in the qPCR as endogenous controls. Fluorescence intensity was recorded by using ABI 7700 Prism SDS 2.1 software (Applied Biosystems) and the results were plotted versus cycle number. The $\Delta\Delta C_t$ method was used to calculate relative changes in mRNA abundance as fold change values (20).

Statistical Analysis

The differences in clinical and hormonal variables between PCOS patients and non-hyperandrogenic controls were evaluated by the Mann-Whitney U test. The differential gene expression was evaluated by using a two-tail unequal variances *t*-test implemented in the Gene Expression Pattern Analysis Suite package (21). Also, a permutation-based statistical method termed Significance Analysis of Microarrays (SAM) was achieved in a two-unpaired classes format, which performs a correction for multiple testing using the false discovery rate method (22). Annotations of PCOS dysregulated probe sets were collected from different available databases by using the NetAffx online tool (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>), and their identity was verified using the BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The sequence of the promoter region (from -1000 to + 100 bp with respect to the start of transcription site) for each dysregulated gene was obtained from the Transcriptional Regulatory Element Database (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/>). A search for androgen response elements in these regions was conducted using the MatInspector software (23), using the V\$ARE.01 and V\$ARE.02 matrixes contained in the MatBase version 6.1 library (Genomatix Software GmbH, München, Germany).

Spearman's non-parametric correlation analysis, and partial correlation analysis, were used to study the influence of age, hyperandrogenism and insulin resistance on gene expression as described below.

Functional analysis was performed on the basis of Gene Ontology (GO) terms by using Onto-Express Tool (24). Significantly over- or underrepresented GO terms among the differentially expressed dataset were obtained in relation to the number of probe sets expected for each GO category, based on their representation on the Affymetrix U133A array. A χ^2 test was performed to determine confidence levels for differential expression within ontology groups and the *P* values were corrected for multiple testing based in the false discovery rate method.

Genesis software (<http://www.genome.tugraz.at>) was used for hierarchical clustering analysis of PCOS-regulated genes applying average linkage and Pearson's correlation as a measure of similarity.

The Transcription Factor Association Test tool (TransFAT) (25) was used to detect under or over-representation of putative transcription factor binding sites (TFBSs) in co-expressed genes. Each gene cluster obtained by clustering analysis was compared against the rest of the altered PCOS genes. TFBSs were searched in the 10 kb upstream region of the selected genes by using Match program. Only TransFAT high-quality matrices were used with a cut-off to minimize false positives. Finally, a Fisher's exact test was performed to obtain significant TFBSs overrepresentation in the cluster we were analyzing. For RT-qPCR analyses, the Mann-Whitney U test was used. Statistical significance was set at the *P* < 0.05 level for all analyses except when correcting for multiple testing.

RESULTS

Description of PCOS patients and non-hyperandrogenic controls

The comparisons of clinical, biochemical, and hormonal variables between PCOS patients and controls are shown in Table 1. PCOS patients were younger, and presented with statistically significant increases in hirsutism scores and free testosterone levels, and decreased SHBG concentrations, compared with non-hyperandrogenic controls. No other differences were found, although indexes of insulin resistance such as fasting insulin and HOMA-IR showed median values that were close to twice as high in PCOS patients compared with non-hyperandrogenic controls. PCOS patients and controls presented metabolic comorbidities with similar frequencies.

Identification of Differentially Expressed Genes Between PCOS Patients and Non-Hyperandrogenic Women

After removing the non-informative probe sets from the analysis, 3,055 of the 22,284 transcripts evaluated on the Affymetrix HG-U133A chip were subsequently analyzed. Microarray data were analyzed by an uncorrected two-tail standard *t*-test after normalization by the MAS5.0 and RMA algorithms, and showed that 391 probe sets were differentially expressed between PCOS patients and non-hyperandrogenic women.

In order to control for multiple testing, we applied the more strict SAM procedure, using an estimated false discovery rate of 0.5%, and 78 of the 391 dysregulated probe sets retained statistical significance. These probe sets exhibited differential gene expression greater than or equal to 1.5-fold. Often more than one probe set detected a similar change in the same gene, providing additional validation of the expression data (Tables 2 and 3).

Of the 78 probe sets, 42 of them -representing 39 genes - were over-expressed in PCOS patients compared with the non-hyperandrogenic women (Table 2), whereas 36 probe sets - representing 24 genes - were under-expressed (Table 3).

To confirm the gene expression pattern by an independent method, we performed RT-qPCR for 50 genes. We found a close correlation between microarray and real-time PCR data and the differential expression was confirmed for most genes. Fig. 1 shows the comparison of gene expression by both methods for 12 genes.

Influence of Age, Hyperandrogenism and Insulin Resistance on Gene Expression

Because patients were younger than controls, we studied the correlation of age and the levels of expression of the 63 genes described above, including PCOS patients and non-hyperandrogenic women as a whole. Age showed significant correlations with the expression of CHI3L1 ($r = 0.59$, $P = 0.021$), CLIC5 ($r = -0.63$, $P = 0.012$), JARID1A ($r = -0.66$, $P = 0.007$), NR1H2 ($r = -0.66$, $P = 0.008$), SCD ($r = -0.62$, $P = 0.014$), TCF4 ($r = -0.64$, $P = 0.011$) and SERINC3 ($r = -0.62$, $P = 0.015$), suggesting that the up- or down-regulation of these genes seen in PCOS samples might result from the younger age of the patients.

Furthermore, the dysregulation of gene expression in the omental tissue of PCOS patients may be a consequence of hyperandrogenism, or may also play a causative role in the insulin resistance characteristic of the syndrome. Of note, several of the genes dysregulated in the omental fat of our PCOS patients contained putative androgen response elements in their promoters (Table 4). Therefore, we studied the correlations between the levels of expression of the 63 genes with free testosterone, as an index of hyperandrogenism, and with HOMA-IR as an index of insulin resistance. Free testosterone levels correlated with the expression of ACTG2 ($r = -0.60$, $P = 0.017$), EBF2 ($r = -0.57$, $P = 0.027$), HLA-DQ1A ($r = -0.61$, $P = 0.016$), JARID1A ($r = 0.57$, $P = 0.027$), RHOQ ($r = 0.65$, $P = 0.009$), and SERINC3 ($r = 0.64$, $P = 0.011$), whereas insulin resistance correlated with SCD expression ($r = 0.53$, $P = 0.043$). However, the expression of JARID1A, SERINC3 and SCD correlated also with age as described above. After correcting the influence of age by partial correlation analysis, the correlations of JARID1A and SERINC3 with free testosterone, and that of SCD with insulin resistance, did not retain statistical significance ($r = 0.38$, $P = 0.183$, $r = 0.51$, $P = 0.064$ and $r = 0.093$, $P = 0.750$ respectively). Therefore,

only hyperandrogenism, and not insulin resistance, correlated with the expression of a few genes (ACTG2, EBF2, HLA_DQ1A, and RHOQ) in our model.

Nevertheless, because 63 separate correlation analyses were performed for each independent variable, it must be highlighted that none of the correlations described above retained statistical significance after applying a Bonferroni correction for multiple testing to the level of significance (decreasing it to $P < 0.00079$), casting doubt upon the actual relevance of all these correlations.

Classification of Dysregulated Genes According to Gene Ontology Categories

Genes with altered expression in PCOS phenotype were subsequently classified into Gene Ontology (GO) categories. The χ^2 test revealed significant ontology groups that were differentially represented in PCOS-dysregulated genes. As shown in Table 5, several of the significantly over-represented GO terms in PCOS patients compared with controls were related to oxidoreductase activity and toxicity including *response to toxin*, *NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity* and *oxidoreductase activity*. GO terms related to *cell adhesion*, *cell recognition and defense response* were significantly represented, yet to a lesser extent, in PCOS samples.

Searching for Gene Expression Patterns

To study the regulatory relationships among dysregulated genes in PCOS, we conducted hierarchical clustering analysis based on their expression profiles. As shown in Fig. 2, co-expressed genes were clustered into two main branches, one of over-expressed genes (6 clusters) and another of under-expressed genes (4 clusters). Different Affymetrix probe sets for the same gene, as well as functionally related genes, appeared together in the same cluster, which gave us an estimation of the reliability of the expression patterns found.

Assuming that co-expressed genes may be co-regulated, the TransFAT tool was used to search for common *cis*-regulatory elements. As shown in Fig. 2, we found some significant associations between

-

putative transcription factor binding sites (TFBSs) and groups of co-expressed genes. We considered only those TFBSs that are significantly over-represented in most of the genes from a particular gene cluster. A significant over-representation of TFBSs previously involved in the pathogenesis of type 2 diabetes was found, including Hepatic Nuclear Factor 4 (HNF4), Forkhead box I (FOXI1) and Forkhead box A2 (FOXA2) (26, 27). Several gene clusters manifested over-representation of transcriptional effectors of Wnt/ β -catenin signaling pathway, such as TCF4 in cluster B, or Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1 (LEF1) in cluster J. We have also observed significant over-representation of MYC binding sites for all three genes in Cluster D and for a very homogeneous sub-group of genes from cluster F.

-

DISCUSSION

Our present results revealed abnormal expression in omental adipose tissue of genes encoding certain components of several biological pathways, described below, that appear to be specific of PCOS because patients and non-hyperandrogenic controls presented with metabolic co-morbidities with similar frequencies.

Abnormalities in Insulin Signaling Pathway

Several genes involved in insulin resistance signaling pathway presented altered expression in the omental adipose tissue from our PCOS patients, in conceptual agreement with the defective *in vitro* insulin-mediated glucose uptake by PCOS adipocytes reported earlier (28, 29).

Over-expression of ENPP1 (also termed PC-1) might contribute to the defective insulin signaling in PCOS patients, because ENPP1 is a negative regulator of insulin receptor tyrosine kinase activity, and interacts with the insulin receptor (IR) α -subunit leading to inhibition its β -subunit (30). Accordingly, increased expression of ENPP1 in adipose tissue and muscle is associated with reduced insulin action in non-diabetic insulin-resistant subjects (31). However, it should be highlighted that the search for association with genomic variation within ENPP1 in PCOS patients has yielded conflicting results (32, 33).

Over-expression of PI3KR1, encoding for the regulatory p85 α subunit of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), could be involved in the development of insulin resistance in our PCOS patients. Mice lacking p85 α have improved sensitivity to insulin (34), and an increase in p85 expression without changes in that of the catalytic subunit of PI3K leads to a reduced insulin sensitivity in skeletal muscle from insulin-resistant individuals (35).

The actin cytoskeleton is essential in regulating the traffic of the glucose transporter 4 (GLUT4) vesicles to the plasma membrane. Several of the genes dysregulated in our study might contribute to insulin resistance by interfering with this mechanism, including the over-expression of RHOQ, PKN2, and

EBF2, (36-38) and the under-expression of two isoforms of actin (ACTG2 and ACTA2) and one isoform of myosin (MYH11). Moreover, the genes encoding MYH11, ACTG2 and ACTA2 contain putative binding sites for the FOXA2 transcription factor (Fig. 2). Considering that the compensatory hyperinsulinemia due to insulin resistance may induce insulin-mediated phosphorylation of FOXA2, resulting in its nuclear exclusion and inactivation of its transcriptional activity (39), we speculate that inhibition of FOXA2 activity in PCOS might be related to the decreased expression of the cytoskeleton proteins found in our series, closing a vicious circle of insulin resistance, hyperinsulinemia, decreased GLUT4 translocation into the cell membrane and further insulin resistance. Yet also, PKN2 encodes a serine/threonine kinase and might be involved in the serine phosphorylation of the IR and IR substrate proteins that has been proposed to impair insulin action in PCOS (40-42).

Furthermore, RHOQ, EBF2 and PKN2 share the same pattern of expression and presents the same putative TFBS for the HNF4 transcription factor previously related to type 2 diabetes (26), suggesting a common involvement of these genes in the mechanism of insulin resistance in omental adipose tissue in PCOS.

Abnormalities in Genes Related to Lipid Metabolism

PDE3B, which encodes the major phosphodiesterase isoform in adipocytes and plays a pivotal role in the antilipolytic action of insulin, and NPR3, encoding the natriuretic peptide receptor C, that might decrease the lipolytic effect induced by natriuretic peptides when activated (43), are over-expressed in our PCOS patients. These antilipolytic genes might represent a compensatory mechanism against increased catecholamine-induced lipolysis – which increases the release of free fatty acids favoring insulin resistance - observed in visceral fat cells from PCOS women (44).

Yet also, lipogenic enzymes such as SCD and ALOX15, a lipoxygenase, were over-expressed in PCOS omental fat possibly contributing to insulin resistance and, because lipoxygenases catalyze the oxidation of several fatty acids leading to different oxidized lipids with inflammatory functions as leukotrienes, to the chronic inflammatory milieu of PCOS. In conceptual agreement, *scd1*^{-/-} knockout

mice show improved insulin signaling in adipose tissue and skeletal muscle (45) and inhibition of lipoxygenases improves insulin action in rat models of insulin resistance and type 2 diabetes (46).

Abnormalities in Genes Related to the Metabolic Syndrome

The expression of *HSD11B1* is increased in the omental tissue of our PCOS patients. This gene encodes for type 1 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase, which catalyzes the conversion of inactive cortisone into active cortisol. By increasing cortisol levels in adipose tissue, increased *HSD11B1* expression has been proposed to play a role in insulin-resistant disorders such as the metabolic syndrome and PCOS (47). Conflicting results have been reported regarding the involvement of common polymorphisms in *HSD11B1* in the pathogenesis of PCOS (48, 49), suggesting that *HSD11B1* over-expression might not be directly related to gene variants.

The over-expression of the leptin gene in omental adipose tissue from our PCOS patients may be secondary to the hyperinsulinemia and putatively increased local cortisol concentrations described above (50), contributing to the increase in serum leptin levels in PCOS patients reported in some previous studies (51).

Evidence for Altered Oxidative Stress Processes

Increased oxidant stress occurs in insulin resistant processes due to hyperglycemia and elevated free fatty acids resulting in the generation of reactive oxygen species. Exaggerated generation of the latter in response to hyperglycemia has been demonstrated in PCOS (52), together with augmentation of oxidant status and a moderated increase in some antioxidants (53). We have found over-expression of genes involved in oxidative stress and toxicity processes such as NQO1, GSTM3, PCYOX1, ALOX15 and DNAJB14, and under-expression of ALDH1A3. The altered expression of genes involved in depleting (GSTM3, NQO1, ALDH1A3) and/or generating toxic products (PCYOX1) reflect the induction or repression of biological pathways as compensatory mechanisms in order to reduce the increased oxidant stress in PCOS adipocytes.

Abnormalities in the Wnt-Signaling Pathway

DKK1, a negative regulator of this pathway, is under-expressed, and TCF4 gene, which encodes for a Wnt transcriptional effector, is over-expressed in PCOS. We also identified several groups of co-expressed genes showing a significant over-representation for putative TFBSs of this pathway (Fig. 2). Wnt-signaling is involved in gender differentiation, folliculogenesis, and ovulation (54), as well as in adipogenesis (55). We hypothesize that the Wnt/ β -Catenin signaling pathway could be disturbed in PCOS adipose tissue, as has been shown for the ovary in previous PCOS gene expression studies (56, 57).

Immunological function

The expression of various genes belonging to the immune system, such as class II major histocompatibility complex molecules, several IgG chains, the BF complement factor, FCGR1A and ARST-1, showed altered expression patterns in PCOS patients. This particular result might be related to differences in the accumulation of macrophages in the adipose tissue during the development of obesity, yet a previous study using microarray analysis reported a similar pattern of gene dysregulation in the ovaries of PCOS women (57). Whether these findings are related to the proinflammatory background contributing to insulin resistance and PCOS remain to be established.

Limitations

The small sample size analyzed possibly contributed to the lack of statistically significant differences in indexes of insulin resistance between patients and controls, and explained why we could not match a subgroup of PCOS patients and controls for insulin resistance to delineate with precision the influence of hyperandrogenism on gene expression. Therefore, we cannot conclude if the dysregulation of the expression of some of the genes described above is a direct consequence of androgen excess on adipose tissue, or a primary omental defect that could influence the pathophysiology of hyperandrogenism

in PCOS patients. Also, it should be highlighted that the present results were obtained in women with morbid obesity, and cannot be extrapolated to women presenting with milder grades of obesity.

Summary and conclusions

Our present results based on microarray analysis revealed differences in the expression pattern of 63 genes, supported by several normalization and statistical approaches, and by the use of RT-qPCR.

Of note, the genes dysregulated in PCOS omental fat are not restricted to those involved in insulin signaling and resistance, but also include other functional pathways related, among others, to Wnt-signaling, inflammation, immune function, and oxidative stress.

The involvement of several biological pathways suggests that the participation of visceral adipose tissue in the pathogenesis of PCOS and its metabolic complications is not limited to the well-known influence of obesity on insulin resistance, and the contribution of hyperinsulinism to ovarian hyperandrogenism, yet actually involves several different pathogenic mechanisms and biological pathways.

Although the use of human samples in microarray studies is limited by the high variability among individuals resulting from the genetic heterogeneity of human beings, and although gene expression analyses should be complemented by functional studies and/or proteomic techniques currently ongoing, our present results demonstrate up- and down-regulation of genes encoding molecules previously proposed to influence the pathogenesis of PCOS, insulin resistance and the metabolic syndrome, and also a considerable number of dysregulated genes that from now on, based on our findings, should be considered as candidate genes for the etiology of PCOS.

Hopefully, the complete characterization of these genes, their proteins and the biological pathways differentially involved in the relationship between visceral obesity and PCOS will contribute to a better understanding of the pathophysiology of this prevalent disorder.

-

REFERENCES

1. **Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL** 2005 The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 26:251-282
2. **Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R** 2002 Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:883-896
3. **Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO** 2004 The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2745-2749
4. **Álvarez-Blasco F, Botella Carretero JJ, San Millan JL, Escobar-Morreale HF** Prevalence and Characteristics of the Polycystic Ovary Syndrome in Overweight and Obese Women. *Arch Intern Med*:In press
5. **Fernandez-Real JM, Ricart W** 2003 Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24:278-301
6. **Hotamisligil GS** 1999 The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245:621-625
7. **Bastard JP, Maachi M, Tran Van Nhieu J, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B** 2002 Adipose tissue IL-6 content correlated with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2084-2089
8. **Nilsson C, Niklasson M, Eriksson E, Bjorntorp P, Holmang A** 1998 Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in body fat distribution at adult age in rats. *J Clin Invest* 101:74-78
9. **Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA** 2005 Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 11:357-374

10. **Ibanez L, Dimartino-Nardi J, Potau N, Saenger P** 2000 Premature adrenarche--normal variant or forerunner of adult disease? *Endocr Rev* 21:671-696.
11. **Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Ong K, Dunger DB, De Zegher F** 2002 Additive effects of insulin-sensitizing and anti-androgen treatment in young, nonobese women with hyperinsulinism, hyperandrogenism, dyslipidemia, and anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2870-2874
12. **Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Sanchon R, Luque-Ramirez M, San Millan JL** 2006 Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod* 21:2257-2265
13. **Zawadzki JK, Dunaif A** 1992 Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: Towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR (eds) *Polycystic ovary syndrome*. Blackwell Scientific Publications, Boston, pp 377-384
14. **Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D** 1981 Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* 140:815-830
15. **Escobar-Morreale HF, Serrano-Gotarredona J, Varela C, García-Robles R, Sancho JM** 1997 Circulating leptin concentrations in women with hirsutism. *Fertil Steril* 68:898-906
16. **Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM** 1999 A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3666-3672
17. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC** 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma insulin and glucose concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419
18. **National Institutes of Health Consensus Development Panel** 1991 Gastrointestinal surgery for severe obesity. *Ann Intern Med* 115:956-961
19. **Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP** 2003 Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4:249-264

-

20. **Livak KJ, Schmittgen TD** 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
21. **Herrero J, Vaquerizas JM, Al-Shahrour F, Conde L, Mateos A, Diaz-Uriarte JS, Dopazo J** 2004 New challenges in gene expression data analysis and the extended GEPAS. *Nucleic Acids Res* 32:W485-491
22. **Tusher VG, Tibshirani R, Chu G** 2001 Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5116-5121
23. **Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T** 1995 MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23:4878-4884
24. **Draghici S, Khatri P, Bhavsar P, Shah A, Krawetz SA, Tainsky MA** 2003 Onto-Tools, the toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res* 31:3775-3781
25. **Al-Shahrour F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J** 2005 BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* 33:W460-464
26. **Love-Gregory LD, Wasson J, Ma J, Jin CH, Glaser B, Suarez BK, Permutt MA** 2004 A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. *Diabetes* 53:1134-1140
27. **Katoh M** 2004 Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 25:1495-1500
28. **Ciaraldi TP, Morales AJ, Hickman MG, Odom-Ford R, Olefsky JM, Yen SS** 1997 Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1421-1425
29. **Marsden PJ, Murdoch AP, Taylor R** 2001 Tissue insulin sensitivity and body weight in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:191-199

-

- 472 30.**Maddux BA, Goldfine ID** 2000 Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor
473 function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 49:13-19
- 474 31.**Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Trischitta V, Frittitta L** 1999 Role of PC-1 in the
475 etiology of insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 892:204-222
- 476 32.**San Millan JL, Corton M, Villuendas G, Sancho J, Peral B, Escobar-Morreale HF** 2004
477 Association of the polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance,
478 type 2 diabetes mellitus, and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2640-2646
- 479 33.**Heinonen S, Korhonen S, Helisalmi S, Koivunen R, Tapanainen JS, Laakso M** 2004 The 121Q
480 allele of the plasma cell membrane glycoprotein 1 gene predisposes to polycystic ovary syndrome.
481 *Fertil Steril* 82:743-745
- 482 34.**Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T,**
483 **Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC,**
484 **Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H,**
485 **Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y, Kadowaki T** 1999 Increased insulin sensitivity
486 and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet*
487 21:230-235
- 488 35.**Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM** 2005 Increased p85/55/50 expression and
489 decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes*
490 54:2351-2359
- 491 36.**Chunqiu Hou J, Pessin JE** 2003 Lipid Raft targeting of the TC10 amino terminal domain is
492 responsible for disruption of adipocyte cortical actin. *Mol Biol Cell* 14:3578-3591
- 493 37.**Vincent S, Settleman J** 1997 The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac
494 GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol* 17:2247-2256
- 495 38.**Dowell P, Cooke DW** 2002 Olf-1/early B cell factor is a regulator of glut4 gene expression in 3T3-
496 L1 adipocytes. *J Biol Chem* 277:1712-1718

39. **Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M** 2004 Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 432:1027-1032
40. **Liu YF, Herschkovitz A, Boura-Halfon S, Ronen D, Paz K, Leroith D, Zick Y** 2004 Serine phosphorylation proximal to its phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance. *Mol Cell Biol* 24:9668-9681
41. **Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z** 1995 Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 96:801-810
42. **Li M, Youngren JF, Dunaif A, Goldfine ID, Maddux BA, Zhang BB, Evans JL** 2002 Decreased insulin receptor (IR) autophosphorylation in fibroblasts from patients with PCOS: effects of serine kinase inhibitors and IR activators. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4088-4093
43. **Sengenès C, Stich V, Berlan M, Hejnova J, Lafontan M, Pariskova Z, Galitzky J** 2002 Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:24-32
44. **Ek I, Arner P, Ryden M, Holm C, Thorne A, Hoffstedt J, Wahrenberg H** 2002 A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance. *Diabetes* 51:484-492
45. **Rahman SM, Dobrzyn A, Lee SH, Dobrzyn P, Miyazaki M, Ntambi JM** 2005 Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases insulin signaling and glycogen accumulation in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E381-387
46. **Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Brignetti D, Luo J, Khandwala A, Reaven GM** 1999 Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* 42:102-106
47. **Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM** 2004 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25:831-866

48. **San Millan JL, Botella-Carretero JI, Alvarez-Blasco F, Luque-Ramirez M, Sancho J, Moghetti P, Escobar-Morreale HF** 2005 A study of the hexose-6-phosphate dehydrogenase gene R453Q and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 83557insA polymorphisms in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4157-4162
49. **Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, Tomassoni F, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR** 2006 Genetic variation in 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism amongst lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2295-2302
50. **Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV** 1999 Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1:22-28
51. **Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis GE, Panidis DK** 2003 The role of leptin in fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 106:118-124
52. **Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP** 2006 Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:336-340
53. **Sabuncu T, Vural H, Harma M** 2001 Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem* 34:407-413
54. **Heikkila M, Prunskaitė R, Naillat F, Itaranta P, Vuoristo J, Leppaluoto J, Peltoketo H, Vainio S** 2005 The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* 146:4016-4023
55. **Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA** 2000 Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289:950-953
56. **Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, McAllister JM, Mosselman S, Strauss JF, 3rd** 2003 The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem* 278:26380-26390

-

- 548 57. **Jansen E, Laven JS, Dommerholt HB, Polman J, van Rijt C, van den Hurk C, Westland J,**
549 **Mosselman S, Fauser BC** 2004 Abnormal gene expression profiles in human ovaries from
550 polycystic ovary syndrome patients. *Mol Endocrinol* 18:3050-3063

-

LEGENDS

Fig. 1. Comparison of gene expression by analyses of microarray and RT-qPCR for 12 genes with altered expression in PCOS patients compared with non-hyperandrogenic women. Data are presented as fold change values from Significance Analysis of Microarrays and $\Delta\Delta C_t$ methods.

Fig. 2. Hierarchical average linkage clustering of dysregulated genes between PCOS (P1-8) and control (C1-7) omental adipose samples. Genes are grouped according to the similarity of their expression patterns across all samples, using the Pearson's correlation as metric distance. The data set includes 78 Affymetrix probe sets previously selected as significantly over- or under-expressed in PCOS samples as described in Results. Each row represents a single probe set and each column represents an experimental sample. Each cell in the matrix represents the \log_2 ratio of the abundance of a transcript to the mean abundance across all experiments. Increasing green intensities denotes genes that decrease in expression and increasing red intensities denotes genes that increase in expression in PCOS samples compared with control samples. Colored bars (A-J) indicate the gene clusters obtained. On the right side of the figure, putative transcription factors binding sites (TFBSs) with significant over-representation in each set of co-expressed genes are shown (P -value < 0.05 in Fisher's test). We have considered only TFBSs present in a high percentage of the genes (as indicated in "% genes" column). ^a Non significant ($P = 0.06$).

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of PCOS patients and controls

	Controls (n=7)		PCOS patients (n=8)		P value
Waist to hip ratio	0.84	(0.10)	0.77	(0.09)	0.281
Hirsutism score	2	(3)	9	(12)	0.004
Systolic blood pressure (mm Hg)	130	(20)	130	(0)	0.902
Diastolic blood pressure (mm Hg)	70	(20)	80	(15)	0.456
Total cholesterol (mg/dL)	180	(43)	178	(74)	0.779
High density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	49	(16)	37	(10)	0.072
Low density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	110	(32)	113	(41)	0.536
Triglycerides (mg/dL)	104	(52)	123	(66)	0.463
Total testosterone (ng/dL)	46	(31)	76	(54)	0.336
Free testosterone (ng/dL)	1.0	(0.5)	1.6	(1.1)	0.040
Sex hormone-binding globulin (µg/dL)	325	(124)	161	(146)	0.009
Dehydroepiandrosterone-sulfate (ng/mL)	982	(1159)	1330	(1630)	0.128
17-hydroxyprogesterone (ng/mL)	0.8	(1.0)	0.8	(0.5)	0.535
Androstenedione (ng/mL)	2.0	(0.7)	4.0	(3.7)	0.053
Fasting glucose (mg/dL)	90	(17)	95	(4)	0.281
Fasting insulin (µUI/mL)	11.8	(17.8)	23.8	(25.6)	0.121
Glucose / insulin ratio	0.06	(0.03)	0.03	(0.03)	0.094
Insulin resistance (HOMA-IR)	2.8	(8.0)	5.4	(6.6)	0.232
Dyslipidemia	1	(14%)	0	(0%)	0.467
Hypertension	3	(43%)	2	(25%)	0.326
Impaired fasting glucose	1	(14%)	0	(0%)	0.467
Type 2 diabetes	0	(0%)	0	(0%)	1.000

Data are medians (interquartile range), or raw numbers (percentage), for continuous and discontinuous variables respectively. HOMA-IR, insulin resistance as measured by homeostasis model assessment. To convert to SI units, multiply, cholesterol by 0.0259 (result in mmol/L), triglycerides by 0.0113 (result in mmol/L), total testosterone by 0.03467 (result in nmol/L), free testosterone by 34.67 (result in pmol/L), sex hormone-binding globulin by 0.111 (result in nmol/L), dehydroepiandrosterone-sulfate by 0.002714 (result in µmol/L), 17-hydroxyprogesterone by 3.026 (result in nmol/L), androstenedione by 3.19 (result in nmol/L), glucose by 0.0555 (result by mmol/L) and insulin by 6.945 (result in pmol/L).

578 Table 2. Up-regulated gene transcripts in PCOS patients compared with non-hyperandrogenic subjects.

579 Fold change values were obtained by the Significance Analysis of Microarrays test.

Affymetrix probe set	Gene Name	Gene Symbol	Fold Change	Function
205969_at	Arylacetamide deacetylase (esterase)	AADAC	1.80	Lipid metabolism
207328_at	Arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15	1.66	Lipid metabolism
209788_s_at	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding	ARTS-1	2.23	Fat cell
219866_at	Chloride intracellular channel 5	CLIC5	1.51	Chloride transport
213998_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	1.61	RNA helicase
219237_s_at	DnaJ (HSP40) homolog, subfamily B member	DNAJB14	1.68	Response to stress
220392_at	Early B-cell factor 2	EBF2	1.72	Transcription
201693_s_at	Early growth response 1	EGR1	1.51	Transcription
205066_s_at	Ectonucleotide pyrophosphatase /	ENPP1	1.70	Insulin signaling
206404_at	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	FGF9	1.54	Growth factor
219054_at	Hypothetical protein FLJ14054	FLJ14054	1.73	
204358_s_at	Fibronectin leucine rich transmembrane protein	FLRT2	1.67	Receptor signaling
219250_s_at	Fibronectin leucine rich transmembrane protein	FLRT3	1.57	Receptor signaling
202554_s_at	Glutathione S-transferase M3	GSTM3	1.71	Detoxification
213831_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ	HLA-DQA1	2.09	Immune response
205404_at	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1	1.50	Steroid metabolism
215698_at	Jumonji, AT rich interactive domain 1A	JARID1A	2.05	Transcription
202040_s_at	Jumonji, AT rich interactive domain 1A	JARID1A	1.58	Transcription
207092_at	Leptin (obesity homolog, mouse)	LEP	1.50	Energy metabolism
219759_at	Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	LRAP	1.55	Antigen processing
213764_s_at	Microfibrillar associated protein 5	MFAP5	1.72	Extracellular matrix
213765_at	Microfibrillar associated protein 5	MFAP5	1.66	Extracellular matrix
219789_at	Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase	NPR3	2.25	Peptide receptor
201467_s_at	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1	1.78	Detoxification
201468_s_at	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1	1.78	Detoxification
209750_at	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member	NR1D2	1.51	Steroid hormone
214680_at	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NTRK2	1.60	Neurotrophin
203803_at	Prencylcysteine oxidase 1	PCYOX1	1.51	Prencylcysteine
222317_at	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	PDE3B	1.52	Insulin signaling
212249_at	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit,	PIK3R1	1.61	Insulin signaling
212629_s_at	Protein kinase C-like 2	PKN2	1.70	Signal transduction
214449_s_at	Ras homolog gene family, member Q	RHOQ	1.63	Insulin signaling
200832_s_at	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	SCD	1.61	Fatty acid
221473_x_at	Serine incorporator 3	SERINC3	1.62	
207057_at	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid	SLC16A7	1.61	Pyruvate transport
221276_s_at	Intermediate filament protein syncoilin	SYNC1	1.52	Structural protein
218930_s_at	Transmembrane protein 106B	TMEM106B	1.51	
212382_at	Transcription factor 4	TCF4	1.67	Transcription
204731_at	Transforming growth factor, beta receptor III	TGFBR3	1.61	TGFβ signaling
221496_s_at	Transducer of ERBB2, 2	TOB2	1.96	Cell proliferation
201387_s_at	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1	UCHL1	1.51	Protein
206658_at	Uroplakin 3B	UPK3B	1.74	

Table 3. Down-regulated gene transcripts in PCOS patients compared with non-hyperandrogenic subjects.

Fold change values were obtained by the Significance Analysis of Microarrays test.

Affymetrix probe set	Gene Name	Gene Symbol	Fold Change	Function
200974_at	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ACTA2	0.60	Cytoskeleton
202274_at	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	ACTG2	0.48	Cytoskeleton
203180_at	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	ALDH1A3	0.48	Aldehyde Detoxification
222168_at	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	ALDH1A3	0.22	Aldehyde Detoxification
202357_s_at	B-factor, properdin	CFB	0.60	Complement activation
210916_s_at	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44	0.60	Hyaluronic acid binding
218182_s_at	Claudin 1	CLDN1	0.51	Cell adhesion
204619_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.60	Hyaluronic acid binding
204620_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.51	Hyaluronic acid binding
211571_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.43	Hyaluronic acid binding
215646_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.48	Hyaluronic acid binding
221731_x_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	0.47	Hyaluronic acid binding
209395_at	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	CHI3L1	0.51	Sugar binding
209396_s_at	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	CHI3L1	0.42	Sugar binding
204602_at	Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	DKK1	0.42	Wnt signaling pathway
214511_x_at	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	FCGR1A	0.59	Immune response
216950_s_at	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	FCGR1A	0.62	Immune response
204419_x_at	Hemoglobin, gamma A	HBG1	0.51	Heme binding
203290_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	HLA-DQA1	0.60	Immune response
209823_x_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	HLA-DQB1	0.62	Immune response
221491_x_at	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	HLA-DRB3	0.43	Immune response
216207_x_at	Immunoglobulin kappa constant	IGKC	0.61	Immune response
214669_x_at	Immunoglobulin kappa light chain mRNA, partial cds	IGKV	0.55	Immune response
214677_x_at	Immunoglobulin lambda joining 3	IGLJ3	0.64	Immune response
217148_x_at	Immunoglobulin lambda joining 3	IGLJ3	0.56	Immune response
214777_at	Immunoglobulin kappa light chain VKJ region mRNA	IGLV	0.40	Immune response

216576_x_at	Clone H10 anti-HLA-A2/A28 immunoglobulin light chain	IGLV	0.44	Immune response
215176_x_at	Partial mRNA for immunoglobulin light chain variable region	IGLV	0.41	Immune response
222379_at	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	KCNE4	0.58	Potassium ion transport
201496_x_at	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	MYH11	0.38	Cytoskeleton
201497_x_at	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	MYH11	0.44	Cytoskeleton
207961_x_at	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	MYH11	0.50	Cytoskeleton
205729_at	Oncostatin M receptor	OSMR	0.58	Cell proliferation
204939_s_at	Phospholamban	PLN	0.55	Calcium ion transport
204338_s_at	Regulator of G-protein signalling 4	RGS4	0.43	Signal transduction
201645_at	Tenascin C (hexabrachion)	TNC	0.47	Cell adhesion

Table 4. List of the genes showing differential expression in omental fat of PCOS patients that contained putative androgen response elements in their promoter regions

Gene	Matrix Similarity	Sequence ^a	Strand	Matrix
<i>Up-regulated genes</i>				
ALOX15	0.91	acccacactgctGTTctt	-	V\$GREF/ARE0.2
ARTS-1	0.91	ctttactttcgGTCCtgg	-	V\$GREF/ARE0.2
FLJ14054	0.9	cgcagctgcctGTCCcag	+	V\$GREF/ARE0.2
FLRT2	0.93	taatagcatgatGTCCttt	+	V\$GREF/ARE0.2
LEP	0.9	gaaatccttgatGTCCctc	-	V\$GREF/ARE0.2
LRAP	0.96	ctagtactactGTACtag	+	V\$GREF/ARE0.2
LRAP	0.99	ctttactttctGTTctaa	-	V\$GREF/ARE0.2
PCYOX1	0.9	gaggccttacaGTTGtcg	+	V\$GREF/ARE0.2
PIK3R1	0.9	ggcatgcgtgatGTCCtac	+	V\$GREF/ARE0.2
PIK3R1	0.97	attggactgcctGTTctag	+	V\$GREF/ARE0.2
PIK3R1	0.89	ttgtggctctgtGTACtct	+	V\$GREF/ARE0.2
SCD	0.96	cgcacgcactcctGTTcagg	-	V\$GREF/ARE0.2
SYNC	0.94	gatggacttgcGTACctc	-	V\$GREF/ARE0.2
TCF4	0.9	taaaaacttacaGTGCtgg	+	V\$GREF/ARE0.2
TGFBR3	0.91	tcccaactccatGTCCtca	-	V\$GREF/ARE0.2
TGFBR3	0.91	gaagggcctcctGTGCtct	+	V\$GREF/ARE0.2
UPK3B	0.81	ccggagcatggTGTTgtgt	+	V\$GREF/ARE0.1
<i>Down-regulated genes</i>				
ACTA2	0.93	tttcccatgctGTTctca	-	V\$GREF/ARE0.2
ACTA2	0.94	ctgccctttctGTTctca	+	V\$GREF/ARE0.2
CD44	0.9	atctttccttaGTCCttc	-	V\$GREF/ARE0.2
FCGR1A	0.83	caagaaccacaTGTTgtct	-	V\$GREF/ARE0.1
MYH11	0.9	ctgagacttggGTCCata	-	V\$GREF/ARE0.2
PLN	0.89	cattaacactttGTGCttc	-	V\$GREF/ARE0.2

^a In capitals: core sequence

The search for androgen response elements was conducted using the MatInspector software (23) using the V\$ARE.01 and V\$ARE.02 matrixes contained in the MatBase version 6.1 library. Matrix similarity values above 0.80 are considered optimal, as perfect matches result in values of 1.00.

Table 5. GO terms differentially represented in PCOS-dysregulated genes. Only GO categories with FDR-adjusted P -value < 0.05 in χ^2 test were considered as significantly over- or under-represented between genes with altered expression in PCOS compared with non-hyperandrogenic samples.

GO Group	GO Term	Found ^a	Total	χ^2	P value
<i>PCOS up-regulated processes</i>					
GO Biological Process	Nitric oxide biosynthesis	2	19	90.86	<0.001
	Response to toxin	2	22	77.95	<0.001
	Xenobiotic metabolism	2	55	28.93	<0.001
	Response to chemical substance	3	314	7.73	0.013
	Fatty acid biosynthesis	2	80	18.76	0.002
	Electron transport	2	457	4	0.021
GO Molecular	Cytochrome b5 reductase	2	9	198.1	<0.001
	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	2	50	450.0	<0.001
	Membrane alanyl aminopeptidase	2	20	87.0	<0.001
	Protein binding, bridging	2	109	13.0	<0.001
	Iron ion binding	2	94	15.6	<0.001
	Oxidoreductase activity	6	815	10.4	<0.001
	Receptor signaling protein activity	2	261	3.6	<0.001
	Extracellular matrix structural	2	151	8.4	0.001
	Growth factor activity	2	246	4.0	0.013
	Extracellular space	4	437	7.9	0.006
GO Cellular	Extracellular matrix	4	494	6.4	0.007
	Membrane	17	5839	1.3	0.047
<i>PCOS down-regulated processes</i>					
GO Biological Process	Cell-cell adhesion	6	248	5.0	<0.001
	Cell recognition	5	27	476.7	<0.001
	Antigen presentation, via MHC class	9	33	137.45	<0.001
	Immune response	7	1144	11.47	<0.001
	Development	11	2805	7.25	<0.001
GO Molecular	Hyaluronic acid binding	6	32	602.3	<0.001
	IgG binding	2	10	105.02	<0.001
	MHC class II receptor activity	3	36	130.58	<0.001
	Sugar binding	7	189	129	<0.001
	Motor activity	5	203	58.19	<0.001
	Actin binding	3	377	7.87	0.001
	Calcium ion binding	5	879	7.5	0.001
	Extracellular matrix	8	494	6.4	<0.001
GO Cellular	Actin filament	2	37	56.0	0.047

^a Number of dysregulated probe sets related to the GO term.

^b Number of probe sets in the HG-U133A chip related to the GO term.

